



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

BIOMONITORAMENTO TOXICOGENÉTICO COMO
INDICADOR DE RISCO À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO URÂNIO
DE RESIDENTES QUE HABITAM AS PROXIMIDADES DA
MAIOR RESERVA DE URÂNIO DO BRASIL, NO MUNICÍPIO DE
SANTA QUITÉRIA – CEARÁ.

FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES

FORTALEZA – CE

2015

FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES

**BIOMONITORAMENTO TOXICOGENÉTICO COMO INDICADOR DE RISCO
À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO URÂNIO DE RESIDENTES QUE HABITAM
AS PROXIMIDADES DA MAIOR RESERVA DE URÂNIO DO BRASIL, NO
MUNICÍPIO DE SANTA QUITÉRIA – CEARÁ.**

**Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia do Departamento de
Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.

FORTALEZA - CE

2015

R1b RODRIGUES, FELIPE AUGUSTO ROCHA.
BIOMONITORAMENTO TOXICOGENÉTICO COMO INDICADOR DE RISCO À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO URÂNIO DE RESIDENTES QUE HABITAM AS PROXIMIDADES DA MAIOR RESERVA DE URÂNIO DO BRASIL, NO MUNICÍPIO DE SANTA QUITÉRIA – CEARÁ / FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES. – 2015.
141 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.

1. Urânio. 2. Biomonitoramento. 3. Cometa. 4. Micronúcleos. 5. Aberrações Cromossômicas. I. Título.
CDD 615.1

FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES

**BIOMONITORAMENTO TOXICOGENÉTICO COMO INDICADOR DE RISCO
À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO URÂNIO DE RESIDENTES QUE HABITAM
AS PROXIMIDADES DA MAIOR RESERVA DE URÂNIO DO BRASIL, NO
MUNICÍPIO DE SANTA QUITÉRIA – CEARÁ.**

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Aprovada em 13/04/2015.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Claudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano
Universidade Federal do Pará – UFPA

Prof. Dr. Fernando Ferreira Carneiro
Universidade de Brasília – UnB / Diretor da Fiocruz Ceará

À Deus.

À minha Família,

Ayla Luz e Silvia Luz.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Empresa BiotechCell.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Cláudia Pessoa**, pelo apoio, incentivo e amizade, confiança, credibilidade, dedicada orientação e muitos aprendizados. Que Deus ilumine nossa amizade nos entendimentos e fortaleza nos desentendimentos diários. Aqui os meus sinceros agradecimentos.

Ao **Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti** pelo entusiasmo no acompanhamento do projeto a amizade. Aprendi a admirá-lo como grande pesquisador.

À **Evelyne Simões** pela amizade e ensinamentos de vida.

Aos membros da **Empresa Biotechcell**, pela confiança em mim deposita.

A **Silvana França, Rogéria e Erivanda França** pela amizade e apoio no Laboratório de Oncologia Experimental.

Ao **Igor Bomfim (Baiano), Assuero Meira e Anderson Feitosa** pelo seletto grupo de amizade.

À **Minha Família**, em especial, meus pais e irmãos pelo apoio diário.

As pessoas que fazem o LOE diariamente.

A **Minha Esposa** por me incentivar a desbravar a vida diariamente.

A **Minha Filha Ayla Luz**; que é simplesmente Linda e Serena.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. Introdução	25
1.1. Urânio	25
1.2. Biomonitoramento Toxicógeno	34
1.2.1. Teste do Cometa	36
1.2.2. Teste do Micronúcleo	41
1.2.3. Teste de Aberrações Cromossômicas	44
1.3. Local da Pesquisa	47
1.3.1. Depósito de Urânio de Santa Quitéria (Itataia) – CE	47
1.3.2. População estudada	48
1.4. Considerações Éticas	49
2. Objetivos	52
2.1. Geral	52
2.2. Específicos	52
3. Materiais e Métodos	54
3.1. Métodos	54
3.1.1. Caracterização das Amostras Populacionais	54
3.1.2. Seleção dos Voluntários	54
3.1.3. Obtenção das Amostras	54
3.1.3.1. Coleta de Sangue Periférico	55
3.1.4. Ensaio do Cometa Alcalino	55
3.1.4.1. Preparação da lâminas	55
3.1.4.2. Lise Celular	56

3.1.4.3.	Neutralização e eletroforese.....	56
3.1.4.4.	Análise dos dados.....	57
3.1.4.5.	Análise Estatística.....	58
3.1.5.	Ensaio de Aberrações Cromossômicas.....	58
3.1.5.1.	Protocolo Experimental.....	59
3.1.5.2.	Análise Citogenética.....	60
3.1.5.3.	Critérios de Análise.....	60
3.1.5.4.	Análises estatísticas.....	61
3.1.6.	Ensaio do Micronúcleo.....	61
3.1.6.1.	Protocolo Experimental para Ensaio de Micronúcleo em Linfócitos.....	61
3.1.6.1.1.	Análise dos Dados.....	62
3.1.6.1.2.	Análises estatísticas.....	62
3.1.6.2.	Protocolo Experimental para Ensaio de Micronúcleo em Reticulócitos.....	62
3.1.6.2.1.	Análise dos Dados.....	62
3.1.6.2.2.	Análises estatísticas.....	63
3.1.6.3.	Protocolo Experimental para Ensaio de Micronúcleo em Mucosa Bucal 63	
3.1.6.3.1.	Análise dos Dados.....	63
3.1.6.3.2.	Análises estatísticas.....	63
3.1.6.4.	Protocolo Experimental para Quantificação de Oxidação Protéica.....	64
3.1.6.4.1.	Análises estatísticas.....	64
3.2.	Materiais Utilizados na Pesquisa.....	64
3.2.1.	Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais:.....	64
3.2.2.	Reagentes, Soluções, Líquidos e Corantes.....	65
4.	Resultados.....	68
4.1.	Coleta das Amostras.....	68
4.2.	Caracterização da população estudada.....	68

4.3. Ensaio do Cometa Alcalino	70
4.4. Ensaio do Cometa Alcalino com utilização da Enzima FPG	71
4.5. Ensaio do Cometa Alcalino com utilização da Enzima ENDO III	74
4.6. Ensaio do Cometa Alcalino com utilização da Enzima hOGG1	76
4.7. Ensaio do Micronúcleos em Linfócitos	79
4.8. Ensaio do Micronúcleos em Reticulócitos	81
4.9. Ensaio do Micronúcleos em Mucosa Bucal	82
4.10. Ensaio de Mensuração de Oxidação Protéica.....	84
4.11. Ensaio de Aberrações Cromossômicas.....	86
5. Discussão	90
6. Conclusão	102
7. Referências Bibliográficas	104
8. Anexos.....	130
8.1. Anexo I - Aprovação da Pesquisa no Comitê de Ética	130
8.2. Anexo II - Declaração da Secretaria Municipal de Itatira.....	132
8.3. Anexo III - Declaração da Secretaria Municipal de Santa Quitéria.....	133
8.4. Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.....	134
8.5. Anexo V – Artigo submetido para Publicação na Revista Ecotoxicology and Environmental Safety	135
8.6. Anexo VI – Produção Bibliográfica - Artigos completos publicados em periódicos.....	136

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Minério de urânio. Fonte: Hore-Lacy, 2015. 26
- FIGURA 2:** Decaimento do ^{238}U e ^{235}U através da emissão de partículas alfa e beta até a formação de chumbo (Pb). Fonte: CNEN, 2015. 28
- FIGURA 3:** Localização geográfica das reservas brasileiras de Urânio. Fonte: INB, 2015. 28
- FIGURA 4:** Marcos do Câncer. Adaptado de Luo *et al.*, 2009. 33
- FIGURA 5:** Caracterização dos Biomarcadores da exposição ambiental à tóxicos. Fonte: Adaptado de Kapka-Skrzypczak, 2011; Farmer e Singh, 2008. 35
- FIGURA 6:** Gama de aplicações do teste do cometa, medindo vários pontos finais experimentais (abaixo da seta) e que refletem em diferentes níveis de determinação do risco de exposição à doença (acima da seta). Fonte: Adaptado de Dusinska, Collins; 2008. 38
- FIGURA 7:** Mecanismo base de desenvolvimento tumoral. Fonte: Adaptado de Strano *et al.*; 2007. 40
- FIGURA 8:** Mecanismo base de formação de Micronúcleos: (a) Origem de um MN a partir de um cromossomo inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomos dicêntricos, os centrômeros se dirigem para os polos opostos da célula. Fonte: Adaptado de Fenech; 2000. 42
- FIGURA 9:** Vários destinos possíveis de células em cultura após a exposição a agentes genotóxicos e/ou citotóxicos. Fonte: Adaptado de Fenech; 2000. 43
- FIGURA 10:** Lesões ao DNA induzidas por radiação. Fonte: IAEA; 2001. 45
- FIGURA 11:** Metáfase de um indivíduo exposta à radiação ionizante, mostrando cromossomos dicêntricos (seta azul) e um em anel (seta laranja). Fonte: IAEA; 2001. 46
- FIGURA 12:** Localização do município de Santa Quitéria no Estado do Ceará. Fonte: Adaptado de IBGE, 2011. 47
- FIGURA 13:** Representação esquemática da localização geográfica da Jazida (seta verde), do município de Santa Quitéria (seta vermelha), do município de Itatira (seta azul) e de seu distrito Lagoa do Mato (seta preta). Fonte: Doação da INB-Ceará, 2013. 49
- FIGURA 14:** Método do Cometa: A – Preparação das Lâminas; B – Eletroforese. 57

FIGURA 15: Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídio e visualizados no microscópio de fluorescência. (Fonte: Modificada de Speit, Hartmann, 1999).	58
FIGURA 16: Sequência esquemática do teste de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico. Fonte: Ramos, 2009.	60
FIGURA 17: Fotomicrografia de linfócitos binucleados portando micronúcleos. Fonte: Fenech <i>et al.</i> , 2003.	62
FIGURA 18: Foto da Unidade Básica de Saúde, Distrito de Lagoa do Mato, Município de Itaitira, Ceará. Fonte: Rodrigues, F.A.R.; 2014.	68
FIGURA 19: Índice de dano ao DNA da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residente ($p < 0.05$); *** valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.	70
FIGURA 20: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima FPG) da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes FPG ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes FPG não bebem/não fumam e residentes FPG bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.	72
FIGURA 21: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima ENDO III) da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ENDO III ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes ENDO III não bebem/não fumam e residentes ENDO III bebem/fumam ($p < 0.05$). analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.	74
FIGURA 22: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima hOGG1) da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes hOGG1 ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes hOGG1 não bebem/não fumam e residentes hOGG1 bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.	77
FIGURA 23: Mutagenicidade, avaliado pela incidência de micronúcleos em linfócitos da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.	79
FIGURA 24: Mutagenicidade, avaliado pela incidência de micronúcleos em reticulócitos da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.	81

FIGURA 25: Mutagenicidade, avaliado pela incidência de micronúcleos em mucosa bucal da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's. 83

FIGURA 26: Mensuração de Oxidação Protéica da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's. 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais Propriedades Físicas do Urânio	25
Tabela 2: Características da População Estudada.....	69
Tabela 3: Índice de danos ao DNA da população não residente e residente.....	71
Tabela 4: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima FPG) da população não residente e residente.....	73
Tabela 5: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima ENDO III) da população não residente e residente.....	75
Tabela 6: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima hGOO1) da população não residente e residente.....	77
Tabela 7: Mutagenicidade avaliada pelo teste MN em linfócitos da população não residente e residente.....	80
Tabela 8: Mutagenicidade avaliada pelo teste MN em reticulócitos da população não residente e residente.....	82
Tabela 9: Mutagenicidade avaliada pelo teste MN em mucosa bucal da população não residente e residente.....	84
Tabela 10: Mensuração de Oxidação Protéica da população não residente e residente. .	85
Tabela 11: Índice mitótico, tipo e frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos da população não residente e residente.....	88

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
<	Menor que
±	Mais ou menos
®	Marca Registrada
µg	Microgramas
µl	Microlitro
µl	Microlitros
µm	Micrometro
¹³⁷ Cs	Césio-137
ANOVA	Analisis of Variance (Análise de Variância)
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro Padrão da Média
Fig.	Figura
g	Gramas
Gy	Gray
h	Hora
Kg	Kilogramas
L	Litro
M	Mol
mA	Miliampere
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimol
ng	Nanogramas
nM	Nanomol
nm	Nanômetro
n°	Número
°C	Graus Celcius
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
pH	Potencial Hidrogênionico
ppb	parte por bilhão
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
t	Tonelada
U	Urânio
U.I	Unidade Internacional
V	Volts
X	Vezes

RESUMO
**BIOMONITORAMENTO TOXICOGENÉTICO COMO INDICADOR DE RISCO
À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO URÂNIO DE RESIDENTES QUE HABITAM
AS PROXIMIDADES DA MAIOR RESERVA DE URÂNIO DO BRASIL, NO
MUNICÍPIO DE SANTA QUITÉRIA – CEARÁ.**

**Tese de Doutorado. Autor: Felipe Augusto Rocha Rodrigues. Orientadora: Dra.
Claudia do Ó Pessoa. Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e
Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.**

O Urânio é representado na tabela periódica pela letra U, sendo o quarto elemento do grupo dos actinídeos. O Brasil, segundo dados oficiais da INB, possui uma das maiores reservas mundiais de urânio. A radiação ionizante do urânio pode interferir nas funções celulares em todos os níveis de organização da célula, induzindo toxicidades química e radiológica. Seu efeito no organismo é cumulativo, e a radiação assim exposta pode afetar o DNA, induzindo o desenvolvimento de neoplasias, como as leucemias. Diante disso, o biomonitoramento de indivíduos expostos à radiação é relatado na literatura como essencial para monitorização humana. O Ceará possui uma das maiores reservas de urânio do Brasil; o depósito de Urânio de Santa Quitéria. O objetivo do presente trabalho tem como finalidade avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos da exposição humana ao urânio no Município de Santa Quitéria, utilizando as técnicas de Ensaio do Cometa Alcalino em linfócitos humanos, Micronúcleos em linfócitos, mucosa oral e reticulócitos humanos, Aberrações Cromossômicas em linfócitos humanos e mensuração de oxidação protéica. As amostras coletadas totalizaram 161 indivíduos, sendo 91 residentes e 70 não residentes. A média de idade da população residente foi de $41,24 \pm 15,00$; com um tempo de exposição, de $34,93 \pm 16,06$. Na análise do cometa alcalino, houve diferença estatisticamente significativa entre os Índices de Dano (IDs) das populações residentes e não residentes de $10,63 \pm 0,61$ e $6,34 \pm 0,31$, respectivamente. Diferenças significativas foram encontradas quando se utilizou no teste do cometa as enzimas FPG, ENDO III, hOGG1. Os maiores índices foram encontradas entre os fumantes e/ou etilistas. Os resultados da avaliação mutagênica, com o teste de MN em linfócitos, MN em reticulócitos e MN em mucosa bucal revelam que não houve diferenças significativas entre os grupos residentes e não residentes. Porém, diferenças significativas foram encontradas entre os fumantes e/ou etilistas. Os resultados de aberrações cromossômicas da população residente revelam que as frequências de aberrações cromossômicas (quebras cromossômicas e cromatídicas) dos grupos da população residente foram significativamente diferentes, quando comparado com aos grupos da população não residente. Não houve diferenças nos resultados de aberrações numéricas e índice mitótico. As mensurações de oxidação protéica de residentes revelam que a dosagem de proteína carbonilada foi significativamente maior, quando comparado o grupo não residente com o residente. As maiores dosagens foram encontradas entre os fumantes e/ou etilistas. Conclui-se que o urânio presente na região geográfica não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA, interferir na montagem das fibras do fuso e impedir a progressão do ciclo celular, o que deve refletir as baixas doses de radiação a que são expostas. As lesões no DNA, bem como alterações cromossômicas observadas nos fumantes expostos pode ser devido ao efeito do tabagismo.

Palavras chave: Urânio, Biomonitoramento, Cometa, Micronúcleos, Aberrações Cromossômicas.

ABSTRACT

TOXICOGENETIC BIOMONITORING OF RESIDENTS NEARBY OF HIGHER URANIUM BRAZILIAN RESERVE AS AN INDICATOR OF HEALTH RISK, IN SANTA QUIERIA MUNICIPALITY – CEARA STATE

Thesis. Author: Felipe Augusto Rocha Rodrigues. Advisor: Dra. Claudia do Ó Pessoa. Faculty of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará.

Uranium is represented in the periodic table by the letter U, it is the fourth member of the group of actinides. Brazil, according to official data of INB, has one of the world's largest reserves of uranium. Ionizing radiation of uranium can interfere with cellular functions at all levels of organization of the cell, inducing chemical and radiological toxicities. Its effect is cumulative in the body, and thus exposed to radiation can affect DNA, inducing the development of malignancies, such as leukemia. Therefore, the biomonitoring of individuals exposed to radiation is reported in the literature as essential for human monitoring. Ceará has one of the largest uranium reserves in Brazil; the deposit of Santa Quiteria uranium. The objective of this study is to evaluate the possible genotoxic and mutagenic effects of human exposure to uranium in the municipality of Santa Quiteria, using the techniques of Comet Assay Alkaline in human lymphocytes, Micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and human reticulocytes, Chromosome Aberrations in human lymphocytes and protein oxidation measurement. Samples collected totaled 161 individuals, 91 residents and 70 non-residents. The average age of the resident population was 41.24 ± 15.00 ; with an exposure time of 34.93 ± 16.06 . In the analysis of the alkaline comet, a statistically significant difference between the damage values (IDs) of local residents and non-residents of 10.63 ± 0.61 and 6.34 ± 0.31 , respectively. Significant differences were found when using the comet assay in FPG enzyme, Endo III, hOGG1. The highest rates were found among smokers and / or drinkers. The results of mutagenic assessment with the MN test in lymphocytes, MN in reticulocytes and MN in buccal mucosa showed no significant differences between residents and non-resident groups. However, significant differences were found among smokers and / or drinkers. The results of chromosomal aberrations of the resident population show that the frequencies of chromosomal aberrations (chromosome and chromatid breaks) of the resident population groups were significantly different when compared to the non-resident population groups. There were no differences in the results of numerical aberrations and mitotic index. The protein oxidation measurements residents reveal that the carbonyl protein dosage was significantly higher when compared to the non-resident company to the resident. The highest levels were found among smokers and / or drinkers. It is concluded that the uranium present in the geographic region is not sufficient to induce breaks in the DNA molecule interfering with the assembly of the spindle fibers and prevent cell cycle progression, which should reflect the low doses that are exposed. Lesions in the DNA as well as chromosomal abnormalities observed in smokers may be exposed due to the effect of smoking.

Keywords: Uranium, biomonitoring, Comet assay, Micronuclei test, Chromosomal Aberrations assay.

**BIOMONITORAMENTO TOXICOGENÉTICO COMO INDICADOR DE RISCO
À SAÚDE POR EXPOSIÇÃO AO URÂNIO DE RESIDENTES QUE HABITAM
AS PROXIMIDADES DA MAIOR RESERVA DE URÂNIO DO BRASIL, NO
MUNICÍPIO DE SANTA QUITÉRIA – CEARÁ.**

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. URÂNIO

O Urânio é representado na tabela periódica pela letra U, sendo o quarto elemento do grupo dos actínídeos ($Z = 89-103$). Foi descoberto em 1789 pelo Químico Alemão Martin Heinrich Klaproth (1743-1817) e seu nome deriva do planeta Urânio, que na Mitologia Grega significa “Pai Celestial”. (Fowler *et al.*, 2015; Hore-Lacy, 2015; Chahine *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2010; Durakovia, 1999). O Urânio é um metal branco-prateado e denso (**Figura 1**), ocorrendo naturalmente no solo e rochas; possuindo traços em águas e alimentos de muitas regiões no mundo; e dentre os elementos de ocorrência natural é o que apresenta a maior massa atômica (tabela 1) (Konietzka, 2015).

TABELA 1: Principais Propriedades Físicas do Urânio

Propriedades	
Símbolo	U
Número Atômico	92
Raio Atômico	240
Massa Atômica (g mol^{-1})	238,029
Configuração eletrônica	$[\text{Rn}], 7s^2, 5f^3, 6d^1$
Ponto de Fusão ($^{\circ}\text{C}$)	1135
Ponto de Ebulição ($^{\circ}\text{C}$)	4131
Densidade	18,9

Fonte: <http://periodic.lanl.gov/92.shtml>.

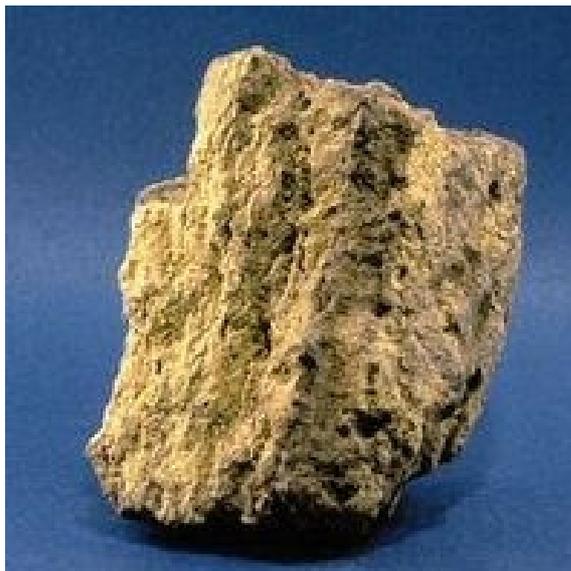


FIGURA 1: Minério de urânio. Fonte: Hore-Lacy, 2015.

Em contato com o ar, o urânio tende a apresentar coloração escura devido à formação de uma fina camada de óxido. Além disso, pode inflamar-se espontaneamente à temperatura ambiente no ar, oxigênio e água. Isso está relacionado com o calor produzido nos microporos do metal. O Urânio reage com a maioria dos elementos não-metálicos como um agente redutor forte. A oxidação de urânio pode provocar uma explosão, sendo o limite inferior para explosão de nuvens de pó de urânio de 55 mg / L (European Food Safety Authority, 2009; Gavrilesco, 2009, Durakoviae, 1999; Ribera *et al.*, 1996).

Antes do advento da energia nuclear, o Urânio tinha um leque de aplicações muito reduzido, sendo utilizado em fotografia e nas indústrias de cabedal (fabricação de peças de couro e sola) e de madeira, além de seus compostos utilizados como corantes e mordentes (fixadores de cor) para a seda e a lã (Ribera *et al.*, 1996, Durakoviae, 1999).

Hoje, a principal importância do Urânio está no fato de ser material radioativo, sendo atribuído esta descoberta ao renomado físico francês, Antoine Henri Becquerel (1852-1908), que foi agraciado com o Prêmio Nobel 1903 em Física pela descoberta da natureza radioativa de urânio em 1896 (Fowler *et al.*, 2015; Dias da Cunha, 2014; Guerra, 1990).

O urânio é, dentre os elementos de ocorrência natural, o mais pesado e é encontrado numa concentração média de 0,0003% (3 mg/Kg) na crosta terrestre. Todos os 22 de seus isótopos atualmente reconhecidos ($^{217-219}\text{U}$, $^{222-240}\text{U}$, ^{242}U) são radioativos.

Os três que ocorrem naturalmente ^{238}U (99,2742%), ^{235}U (0,7204%) e ^{234}U (0,0054%) fazem parte de duas cadeias de desintegração, encabeçados por estes dois últimos. Entre estes o de maior importância é o urânio-235, pois é o único que pode sofrer uma reação de fissão nuclear e sustentar uma reação em cadeia (Fowler *et al.*, 2015; Prat *et al.*, 2010; Bem; Bou-Rabee, 2004; Bleise *et al.*, 2003).

Nestes, um átomo de ^{235}U transforma 11 vezes em diferentes nuclídeos e finalmente se torna ^{207}Pb , enquanto ^{238}U transforma 14 vezes (um dos quais produz ^{234}U) e, eventualmente, transforma-se ^{206}Pb , como demonstrado abaixo (Fowler *et al.*, 2015; Bem; Bou-Rabee, 2004; Bleise *et al.*, 2003).

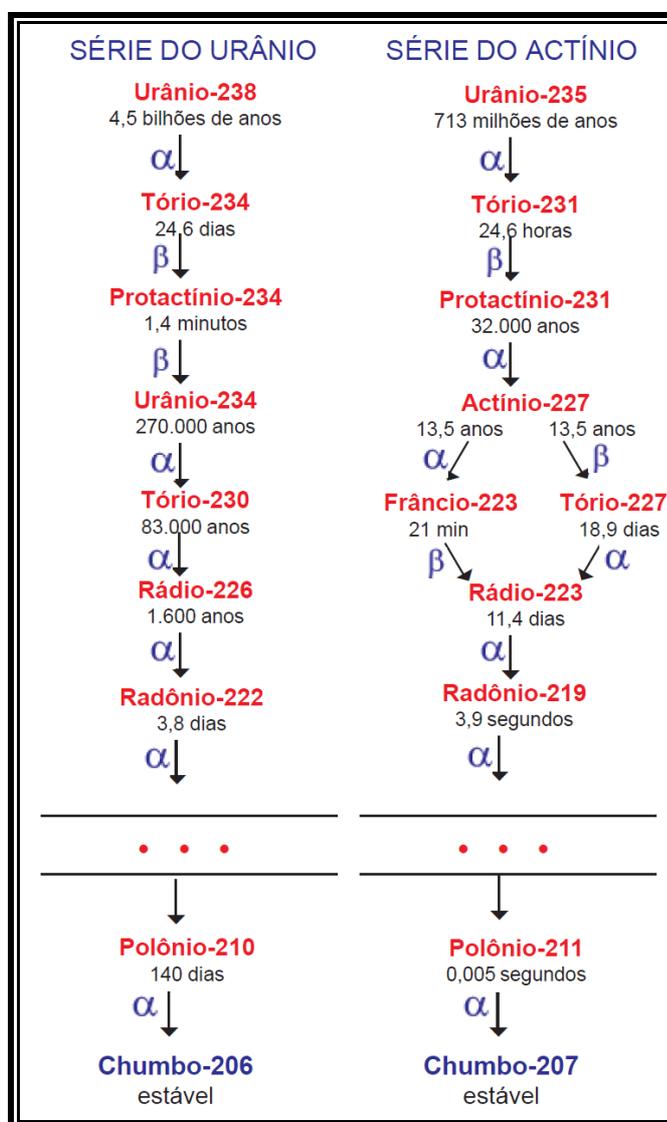


FIGURA 2: Decaimento do ^{238}U e ^{235}U através da emissão de partículas alfa e beta até a formação de chumbo (Pb). Fonte: CNEN, 2015.

A **Figura 2** mostra a ordem pela qual um átomo de urânio transforma através de espécies intermediárias (incluindo rádio e radônio) para se tornar um átomo de chumbo. A proporção de ^{234}U , ^{235}U , e ^{238}U na crosta imperturbável é 0,000055: 0,0072: 0,99275 em massa e 0,489: 0,022: 0,489 por radioatividade (Fowler *et al.*, 2015; Bem; Bou-Rabee, 2004; Bleise *et al.*, 2003).

O urânio é utilizado em indústria bélica (bombas atômicas e espoleta para bombas de hidrogênio) e na construção de usinas nucleares, com o objetivo de geração de energia elétrica. (Ribera *et al.*, 1996; Durakovie, 1999) O urânio empobrecido ou depletado (UE) é um subproduto da indústria nuclear utilizado na fabricação de armas (Bailey *et al.*, 2015; NRC, 2008).

O Brasil, segundo dados oficiais da INB (Indústrias Nucleares do Brasil S.A.) (2015), possui uma das maiores reservas mundiais de urânio, ocupando a 6ª posição no ranking. O País registra a sétima maior reserva geológica de urânio do mundo. Com cerca de 309.000t de U_3O_8 nos Estados da Bahia, Ceará, Paraná e Minas Gerais, entre outras ocorrências (**Figura 3**). As reservas geológicas brasileiras evoluíram de 9.400t (toneladas), conhecidas em 1975, para a atual quantidade (309.370t), podendo certamente ser ampliadas com novos trabalhos de prospecção e pesquisa mineral já que esses foram realizados em apenas 25% do território nacional.



FIGURA 3: Localização geográfica das reservas brasileiras de Urânio. Fonte: INB, 2015.

O primeiro complexo de mineração e processamento de urânio construído no Brasil encontra-se em Poços de Caldas, sul de Minas Gerais, desde 1982; e em 1995 a unidade da INB em Caldas encerrou a produção de urânio, entrando então na fase de descomissionamento. Sua produção tem sido empregada no reator nuclear de Angra I e em programas de desenvolvimento tecnológico. Na cidade de Santa Quitéria/CE está localizada a Jazida de Itataia, que possui recursos de urânio da ordem de 142.500 toneladas associados ao fosfato. Reservas de mineração foram definidos em 79,5 milhões de toneladas de minério com teores da ordem de 11% P_2O_5 e 998 ppm U_3O_8 , sendo 8,9 milhões de toneladas de P_2O_5 e 79,3 mil toneladas de U_3O_8 . Apesar do fato de ser a maior reserva de urânio do país, a produção de urânio só é possível por causa do fosfato associado. A produção econômica de urânio em Itataia é assim condicionado para a produção de ácido fosfórico, que é utilizado na produção de fertilizantes (Gomes *et al.*, 2003).

A radiação ionizante do urânio pode interferir nas funções celulares em todos os níveis de organização da célula, induzindo toxicidades química e radiológica e envenenamento de baixa intensidade (inalação ou absorção pela pele) (Lourenço *et al.*, 2013; Chaudhry, 2008). O urânio produz envenenamento de baixa intensidade (inalação, ou absorção pela pele), produzindo também efeitos colaterais, tais como: náusea, dor de cabeça, vômito, diarreia e queimaduras. Atinge o sistema linfático, sangue, ossos, rins e fígado (Lourenço *et al.*, 2013; Ribera *et al.*, 1996, Durakoviae, 1999); além de possíveis efeitos mutacionais no DNA resultantes de baixas doses de radiação (Chaudhry, 2008).

Seu efeito no organismo é cumulativo (o mineral é paulatinamente depositado, sobretudo nos ossos), e a radiação assim exposta pode provocar o desenvolvimento de neoplasias. Para os trabalhadores das minas, são frequentes os casos de câncer no pulmão (Lourenço *et al.*, 2013; Ribera *et al.*, 1996, Durakoviae, 1999).

A radiação emitida pelo Urânio pode afetar diretamente o DNA, através da energia que nela deposita, ou indiretamente, ionizando outras moléculas estritamente associadas com ela, como o oxigênio e o hidrogênio formando radicais livres que facilmente quebram as ligações químicas no interior das biomoléculas (Miller *et al.*, 2009; Harley, 2001; Newman, 1998).

Experimentos em humanos e em animais são conclusivos a respeito dos efeitos metabólicos adversos e a nefrotoxicidade dos compostos de urânio. A toxicidade radioativa de isótopos do urânio foi descoberta no início da era nuclear, com evidências bem documentadas da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, bem como

consequências mutagênicas e carcinogênicas da contaminação pelo urânio (Durakovic, 1999).

O urânio empobrecido consiste em um elemento onde o isótopo ^{235}U do urânio natural é parcialmente retirado. Ele é utilizado como combustível nuclear. Compostos típicos de urânio empobrecido contêm 99.8% da partícula ^{238}U com meia vida radiotativa de 4.5×10^9 anos, e 0.2% da partícula ^{235}U com meia vida radiativa de 700 milhões de anos. O urânio empobrecido é um metal pesado radioativo e pirofórico, 1.7 vezes mais denso que o chumbo (Schroder *et al.*, 2003).

A exposição humana ao Urânio empobrecido se deu principalmente nas Guerras do Golfo e dos Balcãs, onde este elemento passou a ser utilizado para a fabricação de munição para armas. Alguns veteranos da Guerra do Golfo e dos Balcãs desenvolveram uma síndrome chamada caracterizada por fadiga crônica, dor de cabeça, depressão, perda de memória e outros defeitos cognitivos, distúrbios do sono, agitação, desordens respiratórias e gastrointestinais, dores musculares e nas articulações, doenças da pele e febre intermitente; suspeita-se que muitos destes sintomas sejam devidos à exposição a altos níveis de urânio empobrecido (Strand *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2010; Gao, 2000).

O Urânio empobrecido é radioativo e venenoso. Exposição a altos níveis deste elemento aumenta a incidência de alguns tipos de câncer, como o câncer de pulmão e leucemia, além de causar danos aos rins (Who, 2001). O urânio solúvel é excretado preferencialmente pelos rins, o que explica sua ocorrência na urina e sua nefrotoxicidade (Schroder *et al.*, 2003).

A habilidade do urânio empobrecido de transformar células osteoblásticas imortais humanas em células tumorigênicas foi relatada por Miller *et al.* (1998). Miller *et al.* (2003) também demonstraram, por análise através do Teste do Micronúcleo, que a exposição ao urânio empobrecido causa instabilidade genômica em células expostas.

Em um estudo in vivo, Hahn *et al.* (2002) demonstraram que ratos machos Wistar desenvolveram reações proliferativas locais e sarcomas, quando implantados com fragmentos de urânio empobrecido.

Embora os rins e a medula tenham sido relatados como as reservas primárias do urânio em ratos Sprague–Dawley implantados cirurgicamente com partículas de urânio empobrecido, também foram relatadas acúmulo de urânio no cérebro, linfonodos e testículos destes animais, indicando consequências fisiológicas da exposição ao urânio empobrecido através desta rota alternativa (Pellmar *et al.*, 1999).

Camargo e Mazzilli (1998), encontraram concentrações variando de 2,0 a 28,4mBq/L e de 4,7 a 143mBq/L para ^{238}U e ^{234}U , respectivamente em amostras de água das fontes utilizadas pela população de Água da Prata, Estado de São Paulo, Brasil. Baseando-se nessas concentrações foi estimado o risco devido à ingestão dos isótopos de urânio: um total de 0,3 casos de câncer por 106 indivíduos expostos, indicando que a ingestão crônica de urânio nas concentrações observadas nas fontes analisadas resulta em um acréscimo no número de casos de câncer fatais de 0,1%. Estes dados levaram em consideração que o coeficiente de risco para os isótopos naturais de urânio é o mesmo do ^{226}Ra (radônio), que induz sarcoma ósseo (Finkell, 1953).

Foi relatada a presença de amplicons em células sanguíneas de veteranos da Guerra do Golfo, sendo estas regiões homólogas à região cromossômica 22q11.2, sugerindo que alterações genéticas nesta região possam ser responsáveis pelo desenvolvimento da Síndrome da Guerra do Golfo (Urnovitz *et al.*, 1999). Ainda em estudos com veteranos da Guerra do Golfo foram relatadas diminuições no número de células imunocompetentes (Zhang *et al.*, 1999) e diminuição da capacidade em detoxificar inseticidas organofosforados (Mackness *et al.*, 2000). Todos estes efeitos podem ter relação com a exposição a altos níveis de urânio empobrecido.

Aberrações cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs foram encontradas em metáfases de linfócitos do sangue periférico de veteranos da Guerra do Golfo e dos Balcãs, que supostamente foram expostos a altos níveis de urânio empobrecido (Schroder *et al.*, 2003).

Milacic *et al.* (2004) realizaram uma série de testes em residentes da antiga República da Iugoslávia (Sérvia e Montenegro), onde uma grande quantidade de urânio empobrecido foi utilizada durante o processo de separação em 1999. Os testes incluíram a análise de amostras de sangue de residentes de áreas contaminadas por urânio empobrecido, através de análise espectrofotométrica, contagem sanguínea, observação de mudanças morfológicas celulares, atividade enzimática leucocitária e análise de aberrações cromossômicas. Foi encontrada alta incidência de aberrações cromossômicas e células envelhecidas. A contagem de células sanguíneas encontrou-se diminuída em apenas algumas amostras, enquanto mudanças morfológicas nucleares e citoplasmáticas foram comuns. A atividade leucocitária enzimática encontrou-se diminuída em células com aberrações cromossômicas e alterações nucleares.

A cinética de absorção, distribuição e excreção de urânio e seus compostos depende da forma química do composto, sendo sua absorção baixa por todas as vias de

exposição (inalação, oral e dérmica). Nos fluidos corporais, o urânio geralmente está na forma do cátion bivalente uranila - UO_2^{2+} ; formando complexos com íons citrato e bicarbonato, ou com proteínas plasmáticas; sendo, dessa forma, rapidamente absorvido pelos tecidos ou excretado na urina (Chahine et al., 2012; Singh et al., 2008).

Uma vez que o urânio atinge a corrente sanguínea, por qualquer via de exposição, há uma rápida excreção inicial via renal (>98%) e fecal (<2%) (Kurttio *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 1990; Zhao and Zhao, 1990). A eliminação urinária é facilitada pela natureza dos complexos ultrafiltrados uranilo-bicarbonato e uranilo-citrato. Urânio tetravalente ligado a proteínas plasmáticas são menos filtráveis sendo eliminados por um longo período de tempo. A excreção renal de íons uranilo é rápida em pH alto, já em pH baixo pode ser retardada (Chahine *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2008).

Contudo, qualquer que seja a via de penetração, a toxicidade é sobretudo de ordem química, sendo o rim o órgão preferencial para a sua acumulação e toxicidade química. Deste modo, um sintoma precoce dos efeitos tóxicos do urânio é a presença de albumina na urina que é facilmente detectada. A toxicidade de natureza radiológica está associada, sobretudo a compostos insolúveis (ATSDR, 1999).

A Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP - *International Commission on Radiological Protection*) considera que a massa de urânio no corpo humano oriundo de exposições ambientais é de 90 μg , sendo distribuídos 66% nos ossos, 16% no fígado, 8% nos rins e 16% nos outros tecidos (ICRP, 1995).

Além dos efeitos diretos do urânio, existe ainda a preocupação mundial em relação à exposição a um gás inerte radioativo da cadeia de decaimento do ^{238}U , o radônio (^{222}Rn). Este pode facilmente ser liberado do solo e de rochas contendo urânio para áreas fechadas como casas e minas subterrâneas (Alavanja, 2002).

O estudo epidemiológico de doenças crônicas depende cada vez mais o uso de biomarcadores moleculares, ou seja, parâmetros celulares e bioquímicos que podem ser avaliados relativamente de modo não invasivo, e que normalmente dá uma indicação de exposição ocupacional ou ambiental de um indivíduo a agentes tóxicos que possam causar instabilidade genética provocando o desenvolvimento de mutações e/ou câncer (Collins *et al.*, 2014; Zoriy *et al.*, 2010).

Essas mutações são resultados, frequentemente, de erros ocorridos durante a replicação do DNA e podem ocorrer, também, por exposição a misturas químicas complexas encontradas no ambiente ou no nosso estilo de vida e nas dietas. Esse último processo é denominado de “carcinogênese química” e é dividida conceitualmente em

quatro etapas: iniciação, promoção, conversão para a malignidade e progressão tumoral. As mudanças genéticas resultante da interação química-DNA é definida como iniciação. Com o passar do tempo, ocorrem mudanças genéticas adicionais, oncogenes tornam-se ativos e genes supressores de tumor juntamente com genes de reparo do DNA tornam-se inativos, levando a uma instabilidade genômica. Com a continuidade do processo, o cenário direciona-se para as transformações malignas (expressão de fenótipos malignos), progressão tumoral e metástase (Wang *et al.*, 2015; Hanahan e Weinberg; 2011; Weinberg, 2008; Kummar *et al.*, 2004; Rieger, 2004; Bertram, 2001).

Muitas dessas características fenotípicas (**Figura 4**), chamadas de instabilidade genética, adquiridas por meio de mutações caracterizam-se como ganho de função e/ou amplificação de oncogenes juntamente com a perda de função e/ou silenciamento epigenético de genes supressores de tumor (Hanahan e Weinberg, 2002).



FIGURA 4: Marcos do Câncer. Adaptado de Luo *et al.*, 2009.

1.2. BIOMONITORAMENTO TOXICO-GENÉTICO

Indivíduos expostos a substâncias perigosas, ou até mesmo intoxicação acidental, podem sofrer danos irreversíveis. Com isso, estabeleceu-se o termo “biomonitoramento”; caracterizado por procedimentos e métodos de análises para investigação diagnóstica utilizando amostras biológicas. Uma das definições oficiais da monitorização biológica humana afirma que é "uma atividade permanente de coleta de amostras biológicas para análise de parâmetros de efeitos adversos específicos, com o objetivo de avaliar a exposição e risco à saúde dos indivíduos expostos, comparando os dados observados com o nível de referência, e - se necessário - levando a ações corretivas” (Morello-Frosch *et. al.*, 2015; Kapka-Skrzypczak *et. al.*, 2012).

A detecção precoce de uma exposição perigosa pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos na saúde. As informações provenientes da monitorização da exposição ambiental ou ocupacional possibilitam a implantação de medidas de prevenção e controle apropriadas, sendo necessários: a definição dos níveis permissíveis de exposição, que, de acordo com os conhecimentos atuais, são estabelecidos para não causar efeitos adversos decorrentes da exposição química; e a avaliação regular dos possíveis riscos à saúde associados à exposição por comparação com estes limites permissíveis (Amorim, 2003).

O conceito de monitorização biológica humana provocou um grande interesse entre os cientistas e organizações internacionais, e hoje o biomonitoramento é uma ferramenta útil para avaliar as exposições ambientais e ocupacionais para um determinado composto tóxico (Kapka-Skrzypczak *et al.*, 2012; Farmer e Singh; 2008).

Os biomarcadores são parâmetros relevantes na monitorização biológica e avaliação de riscos à saúde em populações expostas a diversos agentes tóxicos ambientais, incluindo elementos radioativos (AU *et. al.*, 1996). Os biomarcadores tem sido categorizados em três tipos principais: de exposição, de susceptibilidade e de resposta ou efeito (Amorim, 2003).

O indicador biológico de exposição estima a dose interna, através da determinação da substância química ou de seu produto de biotransformação em fluidos biológicos, como sangue, urina, ar exalado e outros, possibilitando quantificar a substância no organismo, quando a toxicocinética é bem conhecida. O biomarcador de Efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, o qual reflete a interação da substância química com os receptores biológicos. Os biomarcadores de suscetibilidade podem refletir fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo

a uma determinada exposição química, indicam ainda quais os fatores podem aumentar ou diminuir um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais (**Figura 5**) (Amorim, 2003)

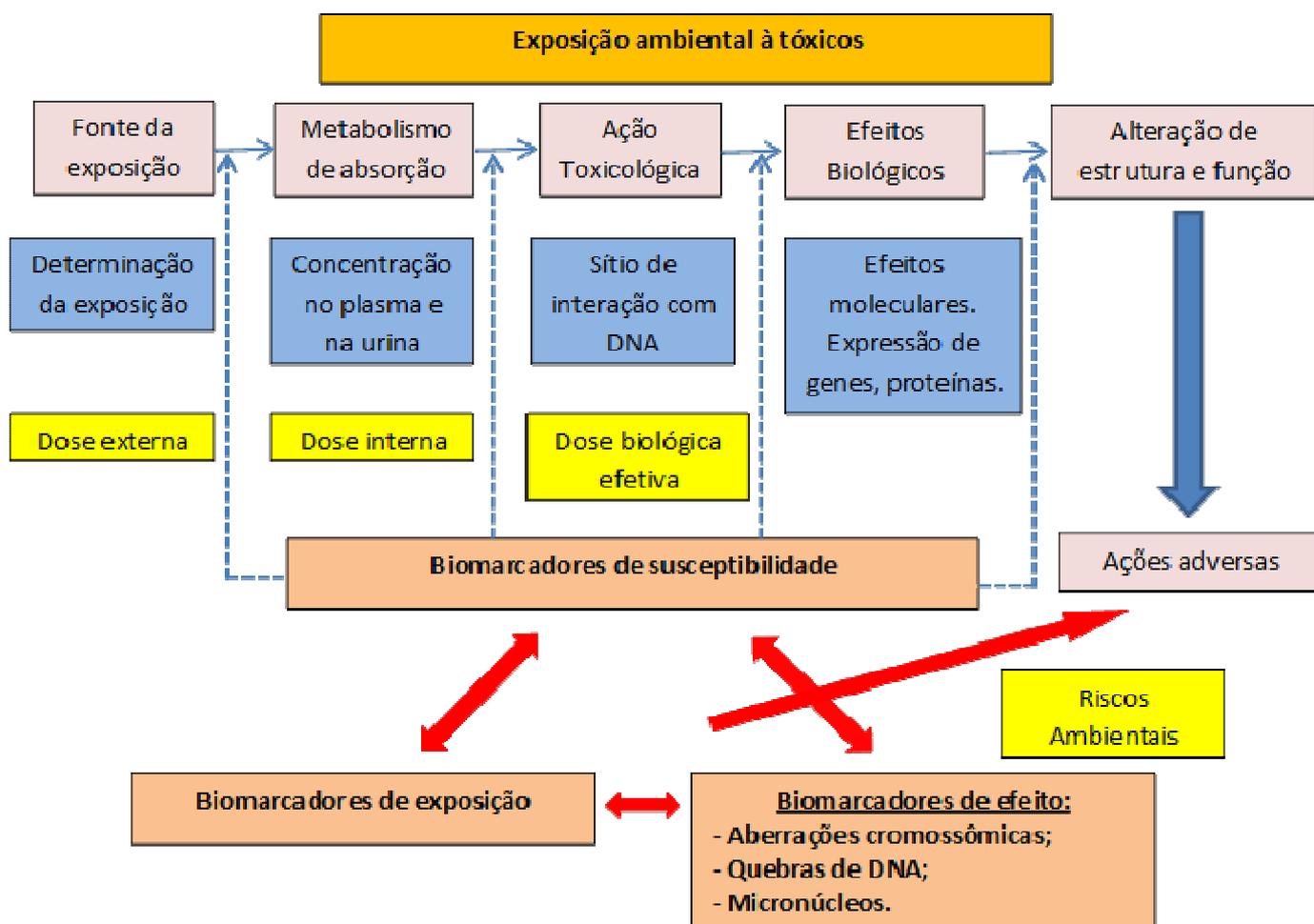


FIGURA 5: Caracterização dos Biomarcadores da exposição ambiental à tóxicos. Fonte: Adaptado de Kapka-Skrzypczak, 2011; Farmer e Singh, 2008.

Os agentes químicos podem danificar as células através de diferentes mecanismos. Com base nestes mecanismos, os compostos podem ser classificados de mutagênicos, genotóxicos ou citotóxicos. Mutagenicidade encerra alterações estruturais de um gene que podem ser mutações pontuais (alterações nas bases da molécula de DNA, duplicações, inserções, inversões e translocações) ou deleções. O potencial genotóxico de um composto é um dos mais importantes fatores de risco para o aparecimento de efeitos a longo prazo como cânceres ou efeitos a nível reprodutivo. São compostos genotóxicos aqueles que diretamente ou indiretamente são capazes de danificar o DNA. A probabilidade deste dano genético originar um efeito real na saúde do indivíduo depende da natureza do dano, da capacidade da célula para reparar ou amplificar esse dano, da oportunidade que a célula pode ter ou não de expressar essa alteração e ainda da capacidade do organismo de reconhecer e suprimir a multiplicação de células aberrantes (Costa, Texeira, 2012; Silbergeld, 2001).

O biomonitoramento da exposição ocupacional a agentes mutagênicos vem sendo atualmente considerado um dos mecanismos de prevenção e controle de doenças genéticas. Os Biomarcadores de genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade são importantes para avaliação de efeitos crônicos de químicos mutagênicos e carcinogênicos (Saff e Henriques; 2003).

O biomonitoramento de indivíduos expostos a compostos tóxicos possivelmente toxicogênicos são relatados na literatura onde se utiliza variados ensaios citogenéticos, como a análise de quebras de fitas de DNA através do ensaio do cometa, ensaios de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) utilizando em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) de indivíduos expostos (Moretti *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2014).

Observa-se uma correlação entre os dados de ensaios do cometa; porém existem relatos que não existem correlações entre os testes do micronúcleos, aberrações cromossômicas e cometa (Koppen *et al.*, 2007; Faust *et al.*, 2004). Linfócitos em cultura oriundos de indivíduos expostos a químicos tóxicos são usados para determinar efeitos dos mutágenos baseados em marcadores citogenéticos, como AC, MN e teste do cometa (Hoffmann, Speit; 2005).

1.2.1. TESTE DO COMETA

O teste cometa permite avaliar de maneira sensível a presença de lesões nas fitas de DNA e, ainda, se as agressões estão sendo reparadas pela célula (Villela *et al.*, 2003).

Sabe-se que o teste do cometa possui origem nos trabalhos feito por Peter Cook e seus colegas. Eles descreveram estruturas semelhante ao núcleo, mas desprovidas de proteínas degradadas quando células eram lisadas em soluções que continham detergentes não iônicos e altas concentrações de sais. Descobriram que esses “nucleoides” eram rodeados por um halo visível apenas quando irradiados com raios x ou incubados com corantes intercalantes, como o brometo de etídeo (Collins et al., 2014).

O primeiro trabalho científico publicado com teste de cometa, embora ainda não utilizando este termo que foi introduzido anos depois por Olive *et al.* por volta de 1990, são dos autores Ostling e Johanson em 1984 com o título “*Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*”. O pH do tampão de lise e eletroforese utilizados foi 9,5 e a análise foi realizada utilizando acridina laranja. Foram constatados efeitos pronunciados de raios gama na dose de 3 Gy (Gray), onde descreveram uma migração mais pronunciada de DNA em direção ao ânodo. Singh *et al.* independentemente em 1988 desenvolveu um método semelhante, com uma eletroforese com pH mais elevado, sendo chamado de versão alcalina. Com isso, detectou efeitos de raios x em uma dose em torno de 2Gy (Møller *et al.*, 2015; Collins *et al.*, 2014).

O ensaio do cometa em forma alcalina foi rapidamente adotado para usar em ensaios de genotoxicidade, tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” (Azqueta *et al.*, 2013); pois quando células são expostas a agentes genotóxicos pode-se observar uma migração em forma de calda de um cometa, muitas vezes relatada como “nuvem”. Enquanto pensava-se no passado que tais cometas representam células (apoptose/necrose) mortas, agora está claro que eles simplesmente representam células com níveis relativamente altos de dano (mas ainda potencialmente reparáveis, e consistentes com viabilidade) (Collins *et al.*, 2014; Lorenzo et al., 2013).

Este teste, com pequenas modificações no protocolo podem aumentar a variedade de utilização do teste, podendo avaliar danos oxidativos nas bases nitrogenadas das fitas da dupla hélice (Dehon *et al.*, 2008). Essas modificações incluem a introdução de tratamento com enzimas de restrição que permitem a detecção de danos em bases púricas (FGP- Formamidopirimidina DNA glicosilase) e pirimídicas oxidadas (ENDO III- Endonuclease III); e a glicosilase (hOGG-1) que age via excisão de bases removendo guaninas oxidadas no DNA (Tice *et al.*; 2000; McCarthy *et al.*, 1997).

O ensaio do cometa tem aplicações em áreas da ciência biomédica e saúde ambiental, tais como a biomonitoramento das populações humanas para a exposição ambiental ocupacional a agentes genotóxicos, avaliação de danos no DNA e estresse oxidativo em conexão com várias doenças (Dusinska, Collins; 2008).

USOS E MEDIDAS COM ENSAIO DO COMETA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO BIOMONITORAMENTO

Exposição externa	Exposição interna	Susceptibilidade Individual	Efeitos intermediários	Endpoint
- <i>Monitoramento do ambiente.</i>	- <i>biodisponibilidade</i> ; - <i>metabolismo;</i>	- <i>variação genotípica e fenotípica;</i> - <i>metabolismo de fase I e II;</i>	- <i>mutações;</i> - <i>aberrações cromossômicas;</i> - <i>Apoptose.</i>	- <i>doença;</i> - <i>morte.</i>

Relevância crescente



Mensurações no teste do cometa:

Contaminação Ambiental e Ocupacional	Quebras no DNA Danos em bases	Capacidade de reparo do DNA (variação fenotípica): Reparo de quebra Reparo de excisão de base (BER) Reparo de excisão de nucleotídeo (NER)	Dano oxidativo no DNA são marcadores preditivo de doenças associadas ao estresse oxidativo.	Elevados danos ao DNA estão associados à doenças (como causa ou efeito).
--------------------------------------	----------------------------------	---	---	--

FIGURA 6: Gama de aplicações do teste do cometa, medindo vários pontos finais experimentais (abaixo da seta) e que refletem em diferentes níveis de determinação do risco de exposição à doença (acima da seta). Fonte: Adaptado de Dusinska, Collins; 2008.

Grande parte dos ensaios com cometa tem utilizado linfócitos (a rigor células mononucleadas de sangue periférico-PBMC), relativamente fáceis de obter. Porém, é importante o uso de outras células e tecidos, como células da mucosa bucal (Dusinska e Collins; 2008).

O ensaio do cometa é uma ferramenta valiosa para quantificar o dano ao DNA em populações expostas a vários tipos e doses de agentes genotóxicos, e pode contribuir para a “dosagem do efeito biológico de exposições ocupacionais e ambientais”. Mais, quando não há marcadores exposição internos confiáveis disponíveis, o teste do cometa pode ajudar com uma identificação precoce de riscos à saúde. Estudos sobre a radiação ambiental com indivíduos monitorados após o acidente de Chernobyl, ou que vivem em uma área de mineralização de urânio registraram danos relativos no DNA variando de 1,1 à 7,5 vezes em relação ao grupo controle (Collins *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2013; Dusinska, Collins; 2008).

Danos ao DNA podem ser reparados por duas vias principais: reparo de excisão de nucleotídeos (“*Nucleotide Excision Repair*” - NER), que representa um dos mais importantes processos de reparo de lesões no DNA e tem sido intensivamente estudado. Esse mecanismo apresenta uma enorme versatilidade e universalidade em reparar lesões que causam distorções na dupla hélice do DNA, tais como dímeros de timina, geradas, principalmente por agentes exógenos. Esse reparo envolve aproximadamente 30 proteínas que atuam em cinco passos sucessivos: a) reconhecimento da lesão; b) abertura da dupla hélice do DNA onde está localizada a lesão; c) dupla incisão na extremidade dessa lesão; d) síntese de novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e e) ligação da porção 5’ da nova fita sintetizada à sequência original (De Boer *et al.*, 2000). Para uma NER eficiente são necessários modificações em histonas por acetilação e remodelação de nucleossomos (Guo *et al.*, 2011). Polimorfismos genéticos, por exemplo, no gene XRCC1 envolvida na reparação de DNA de quebras de cadeia simples formados por exposição à radiação ionizante, pode também afetar a capacidade dos reparos (Wang *et al.*, 2014; Chaing *et al.*, 2010). Reparos por excisão de base (“*Base Excision Repair*” - BER) é responsável pela remoção de uma grande variedade de lesões, como bases desaminadas, alquiladas, oxidadas ou ausentes. O passo inicial do BER consiste no reconhecimento e excisão de bases danificadas pelas glicosilases (Slupphaug *et al.*, 2003). Uma das lesões oxidativas mais estáveis e mutagênicas, a 8-oxoG, pode parear tanto com a citosina como com a adenina, quase que com a mesma frequência, resultando em uma transversão GC para TA (David *et al.*, 2007). (Legrand *et al.*, 2008 e Asagoshi *et al.*, 2010).

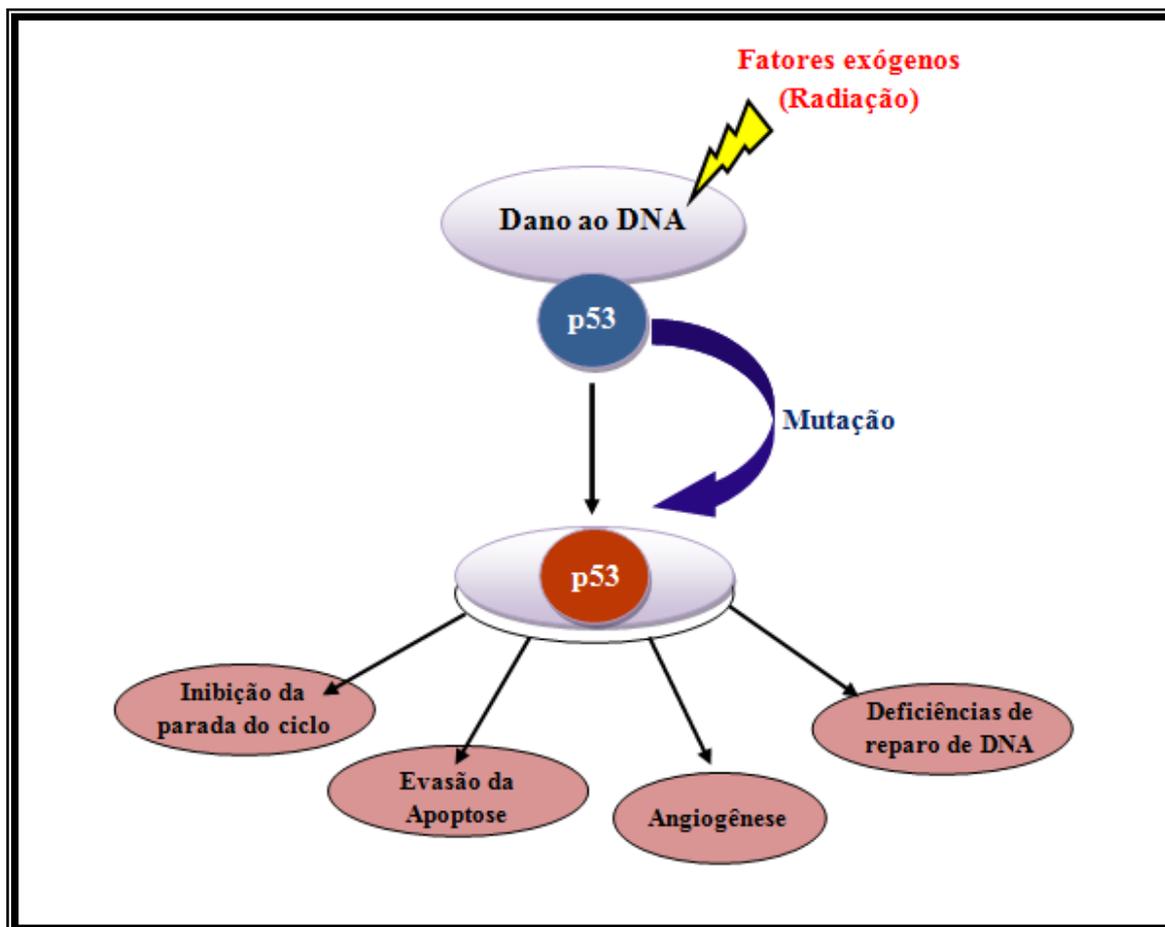


FIGURA 7: Mecanismo base de desenvolvimento tumoral. Fonte: Adaptado de Strano *et al.*; 2007.

Quando as células são expostas a agentes que lesam o DNA, genes críticos podem ser danificados, a exemplo do gene p53 (**Figura 7**) que atua na parada do ciclo celular promovendo um atraso para prover o tempo destinado ao reparo do dano antes da síntese replicativa do DNA. Uma disfunção nesses genes e falhas no reparo resulta na replicação de lesões mutagênicas, que, em acúmulo, favorecem as mudanças genéticas, incluindo transformações neoplásicas (Bartkova *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2004; Mori, 2002; Bardelli *et al.* 2001).

Devido ao fato de danos ao DNA serem extremamente danosos, o Teste do Cometa tem sido empregado em estudos regulatórios, de biomonitoramento humano ambiental, avaliação de mecanismos, novos fármacos e produtos químicos, de diagnóstico e tratamentos médicos, ecogenotoxicidade e quimioprevenção (Brianezi, 2011).

1.2.2. TESTE DO MICRONÚCLEOS

Os micronúcleos (MN) são massas de cromatina originadas de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que se perdem durante a anáfase na divisão celular, devido a agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) ou aneugênicos (induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal); também podem ser formados pela interação de agentes químicos, físicos, biológicos com estruturas não genômicas, que promovem distúrbios na maquinaria mitótica e falha na segregação dos cromossomos (Monteiro Gil *et al.*, 2014; Thierens, Vral; 2009; Fenech, 2000). A ação dos agentes pode originar os micronúcleos, um ou vários por célula, que resultam em fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em migração para os pólos da célula durante a anáfase (Monteiro Gil *et al.*, 2014; Thierens, Vral; 2009).

O teste do Micronúcleo (MN) foi desenvolvido em 1985 por Fenech e Morley, sendo desde então um método bastante confiável e muito utilizado para quantificar material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético. Os MN podem ser resultados de pequenos fragmentos de cromossomos acêntricos que não foram incorporados nos núcleos de “células-filhas” durante a divisão celular. Eles são envolvidos por uma membrana nuclear e aparecem como pequenos núcleos, micronúcleos, no citoplasma e fora dos “núcleos-filhos” principais. Ocorre também formação de pontes a partir de cromossomos dicêntricos, que após rearranjos cromossômicos podem ser classificados como micronúcleos (**Figura 8**) (Monteiro Gil *et al.*, 2014; Thierens e Vral; 2009; Fenech, 2000).

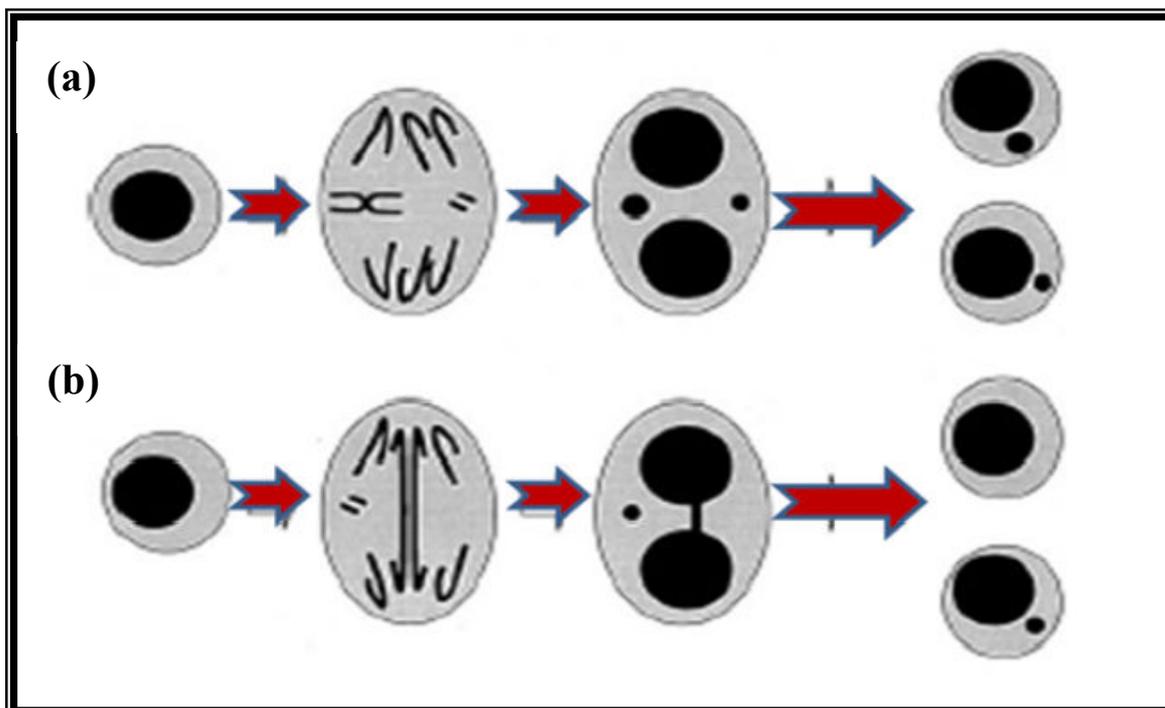


FIGURA 8: Mecanismo base de formação de Micronúcleos: (a) Origem de um MN a partir de um cromossomo inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomos dicêntricos, os centrômeros se dirigem para os postos opostos da célula. Fonte: Adaptado de Fenech; 2000.

No teste do Micronúcleos, as células que tenham completado a divisão celular são impedidas de realizar a citocinese devido o uso de Citocalasina B; cuja ação é de inibição de polimerização da actina necessária para a formação do anel que contrai o citoplasma entre as células filhas (Thierens, Vral; 2009; Fenech, 2000).

No teste de MN podemos mensurar: (1) as pontes nucleoplasmáticas, que indicam o rearranjo de cromossomos que ocorrem quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos ou cromátides são puxados para os pólos da célula durante a anáfase ou fusão de telômeros depois de quebras duplas de fita do DNA (Umegaki e Fenech, 2000); (2) brotos, que representam um mecanismo o qual a célula remove amplificação de DNA que é considerado como um marcador de amplificação de genes, originada de fragmentos acêntricos terminal ou intersticial (Lindberg *et. al.*, 2007).

Devido sua boa confiabilidade e reprodutibilidade, o ensaio do Micronúcleo tornou-se uma dos padrões de técnicas citogenéticas para testes de toxicologia genética em células humanas de mamíferos em geral (Thierens e Vral; 2009; Fenech, 2000).

O teste do MN é reconhecido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OCDE/OECD (“*Organization for Economic Cooperation and Development*”) através do *Guideline 471: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, e aceito pelos países membros através de suas agências reguladoras. No Brasil, além de estudos de biomonitoramento, é aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como parte dos estudos de segurança toxicológica necessários ao desenvolvimento de fármacos, químicos em geral, implantes para humanos, dentre outros (ANVISA, 2015; OECD, 2015).

No campo da proteção radiológica, o ensaio do Micronúcleo utilizando PBMC, além de células esfoliadas da mucosa bucal, tornou-se bastante adequado; sendo considerado uma ferramenta de dosimetria biológica bastante útil para avaliar exposições ocupacionais e acidentais de indivíduos expostos à radiação. A **Figura 9** descreve os vários caminhos e eventos que pode ser esperado para ocorrer de células em cultura expostas a agentes genotóxicos e/ou citotóxicos. Células em apoptose e necrose devem ser diferenciadas pela fragmentação nuclear, condensação da cromatina, “*blebbings*” na membrana plasmática e presença de vacúolos citoplasmáticos (Mellier *et al.*, 2010; Thierens, Vral; 2009; Fenech, 2000).

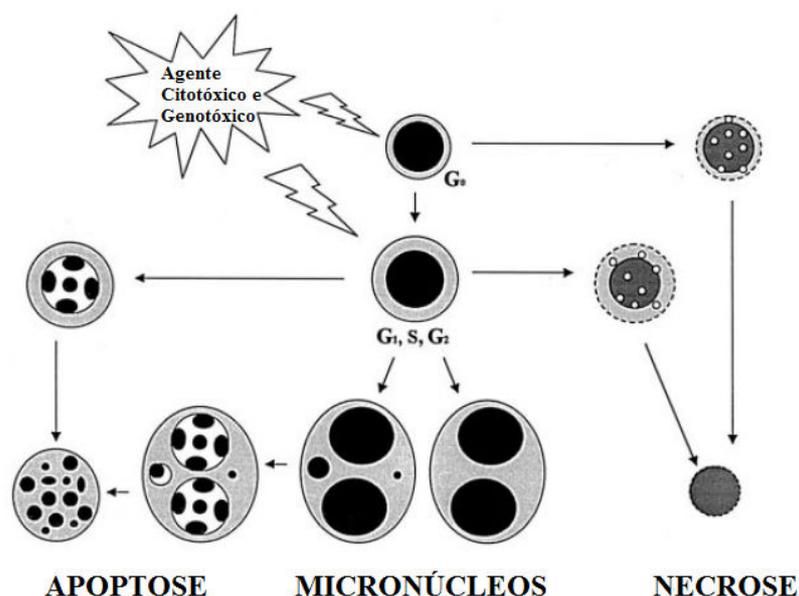


FIGURA 9: Vários destinos possíveis de células em cultura após a exposição a agentes genotóxicos e/ou citotóxicos. Fonte: Adaptado de Fenech; 2000.

Estudos demonstram uma clara correlação entre formação de micronúcleos e doses consideráveis de radiação (Thierens, Vral; 2009; Fenech, 2000). Frequências de MN em sangue periférico tem sido mundialmente estudada como um biomarcador de danos cromossômicos para testes de genotoxicidade e estudos de biomonitoramento humano (Decordier *et al.*, 2009).

1.2.3. TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

O teste de aberrações de aberrações cromossômicas (AC) em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) já vem sendo utilizado a mais de 30 anos como um biomarcador de exposição ambiental e ocupacional a agentes genotóxicos (Bonassi *et al.*, 2005; Hagmar *et al.*, 2004). Esse teste detecta mutações cromossômicas, ou seja, alterações que ocorrem na estrutura de cromossomos, como quebras, formação de anéis, aumento no número de centrômeros, dentre outros (Shaham, *et al.*, 2001); e passou a ser utilizado em estudos de biomonitoramento sendo uma ferramenta útil e apresentando dados imprescindíveis para prever efeitos de agentes genotóxicos sobre a saúde humana (Knudsen e Hansen, 2007).

Sabe-se que as aberrações cromossômicas tem papel fundamental na carcinogênese, pelo fato de que quebras em sítios específicos da molécula do DNA podem às vezes coincidir com a localização de oncogenes (Shaham *et al.*, 2001). Os primeiros dados epidemiológicos demonstrando que a frequência de AC em linfócitos periféricos podem prever a incidência de câncer em populações humanas foram publicados no início de 1990; enquanto que, bem mais antigo são os estudos de Müller; que por volta de 1929 demonstrou, utilizando *Drosophila*, evidências de que os raios X poderiam induzir aberrações cromossômicas (IAEA; 2001).

Aberrações cromossômicas são classificadas quanto a mudanças nas estruturas (perda de pedaços ou inversões) ou alterações numéricas (falta ou excesso) de cromossomos nas células. As alterações estruturais são resultantes de quebras que ocorrem, em geral, antes da duplicação do DNA; e já se sabe que a frequência aumenta na presença de agentes clastogênicos. Dentre as alterações estruturais podemos citar: deleção (resultando em desequilíbrio cromossômico por perda de segmentos (genes), normalmente em razão da quebra de algum filamento do DNA), translocação (quando dois cromossomos sofrem quebras e o seguimento de cada um é transferido (soldado) para a estrutura do outro cromossomo), ou inversão (é a ocorrência de duas quebras em um cromossomo unifilamentoso durante a interfase, e eventual inclusão em posição

invertida no fragmento restante do cromossomo). Já as aberrações numéricas incluem os casos em que há aumento ou diminuição do número do cariótipo normal; sendo classificadas em: euploidias (alterações com número de cromossomos múltiplo do número haploide, por exemplo, $3n$, $4n$) e aneuploidia (alterações onde há falta ou excesso de algum cromossomo, por exemplo, trissomia) (Kasahara, 2009).

Os mutágenos químicos e físicos induzem diversas lesões no DNA que podem ser reparadas ou processadas; porém muitas levam a formação de AC. Dentre as lesões atribuíveis à radiação ionizante temos as quebras de fita simples e dupla (SSB e DSB), danos de bases e ligações cruzadas entre DNA e proteínas (“cross-links”) (**Figura 10**) (IAEA; 2001).

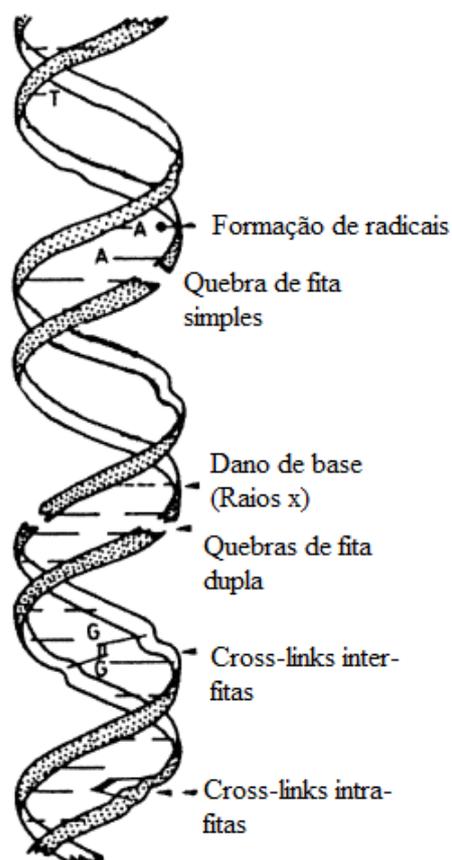


FIGURA 10: Lesões ao DNA induzidas por radiação. Fonte: IAEA; 2001.

Lesões induzidas que levam a formação de ACs podem ser estáveis ou instáveis; sendo as primeiras relacionadas a pequenos danos, translocações recíprocas e algumas aneuploidias, que não impedem a divisão e proliferação celular. Enquanto que, as instáveis, como os cromossomos dicêntricos e em anel, grandes deleções e fragmentos,

normalmente são letais à célula (**Figura 11**). Diferentes alterações podem se acumular nas sucessivas divisões celulares e produzir mutações em genes, os quais teriam um papel fundamental no processo de carcinogênese. As ACs instáveis são geralmente consideradas específicas da exposição à radiação ionizante e vêm sendo amplamente utilizada para avaliação de indivíduos expostos a radiação (Voisin et al., 2002; IAEA; 2001; Little, 2000).



FIGURA 11: Metáfase de um indivíduo exposta à radiação ionizante, mostrando cromossomos dicêntricos (seta azul) e um em anel (seta laranja). Fonte: IAEA; 2001.

A frequência e os níveis de AC em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) de humano torna-se relevante em estudos de biomonitoramento, identificando populações expostas à genotóxicos e que correm o risco de adquirirem câncer (Hagmar *et. al.*, 2004; Dearfield, 2002; IARC, 2000). Altas frequências de AC em PBMC com o proposito dosimetria de exposição à mutágenos químicos tem-se constituído uma técnica importante para estimar riscos de exposições ocupacionais; sendo a presença de AC uma possível ligação com a exposição à genotóxicos (Ribeiro *et al.*, 2003).

1.3. LOCAL DA PESQUISA

1.3.1. DEPÓSITO DE URÂNIO DE SANTA QUITÉRIA (ITATAIA) – CE

O depósito de Urânio de Santa Quitéria, conhecido como Itataia, está localizado no Distrito Fósforo-Uranífero (P-U), na parte central do Estado do Ceará, a cerca de 45 km a sudeste da cidade de Santa Quitéria e 212 km da capital, Fortaleza (Figura 12).

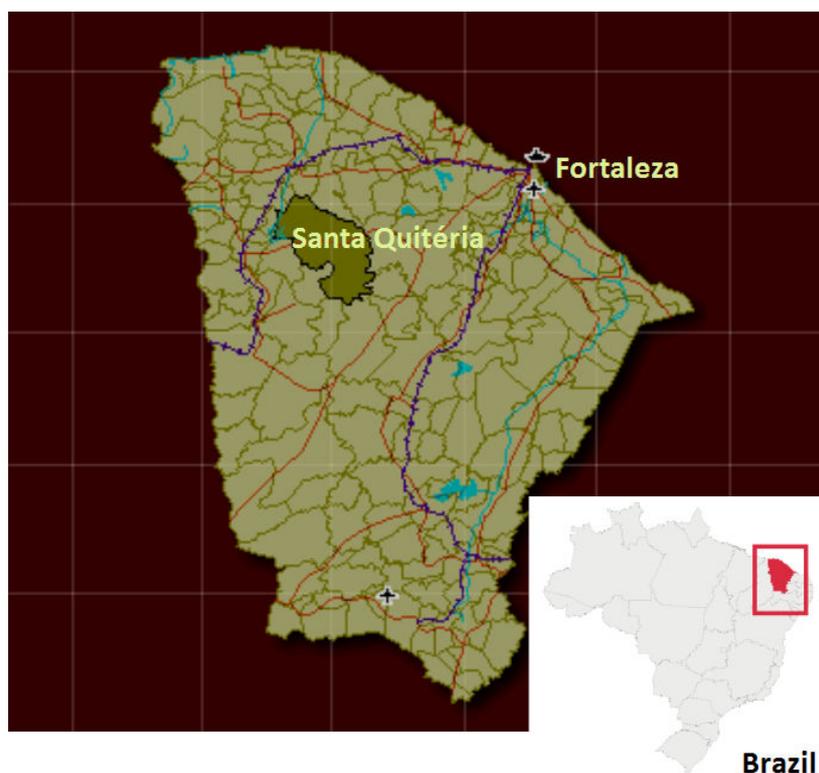


FIGURA 12: Localização do município de Santa Quitéria no Estado do Ceará. Fonte: Adaptado de IBGE, 2011.

Essa jazida possui reservas geológicas de 142,5 mil toneladas de urânio associado ao fosfato. Nesta reserva, o urânio (80 mil toneladas de U_3O_8) ocorre nas rochas junto com fosfato (P_2O_5) e também com cerca de 300 milhões de m^3 de mármore, puro, sem contaminantes radioativos, o que fortalecerá o setor de rochas ornamentais (INB, 2008).

Embora o depósito de Santa Quitéria seja a maior reserva conhecida de urânio que o Brasil possui, sua viabilidade econômica é dependente da exploração do fosfato associado. Isto significa que a extração de urânio está condicionada à produção de ácido fosfórico - insumo utilizado na produção de fertilizantes. Por essa razão, o INB fez um

vínculo com a empresa privada Galvani que será a responsável por explorar essa jazida (Prado, 2007).

Geologicamente, o distrito P-U divide-se em duas unidades tectônicas conhecidas como Cinturão Dobrado de Jaquaribe e o Maciço de Santa Quitéria, sendo esses limites realçados por duas grandes falhas transcorrentes conhecidas como Groaíra e Itatira (ABEN, 2010).

A retomada da construção da usina nuclear Angra 3 marca também o recomeço do processo para iniciar a exploração da reserva de urânio de Santa Quitéria (CE) pela estatal INB. O objetivo é alcançar a autossuficiência de todo o ciclo de produção do combustível, da mineração até o produto final, enriquecido e encapsulado, para funcionamento das usinas Angra 1, 2 e 3 (Folha Online, 2007). Estima-se que a mina produzirá 180 mil toneladas de fosfato e 1,2 mil toneladas de urânio por ano, com capacidade produtiva plena de 240 mil toneladas de fosfato e 1,5 mil toneladas de concentrado de urânio por ano (ABEN, 2010).

1.3.2. POPULAÇÃO ESTUDADA

Apesar de a Jazida está localizada geograficamente no município de Santa Quitéria; esta está mais próxima do município de Itatira e do seu distrito Lagoa do Mato (**Figura 13**). E devido a sua proximidade, a população de escolha para o estudo foram residentes de Lagoa do Mato, distrito de Itatira/CE.

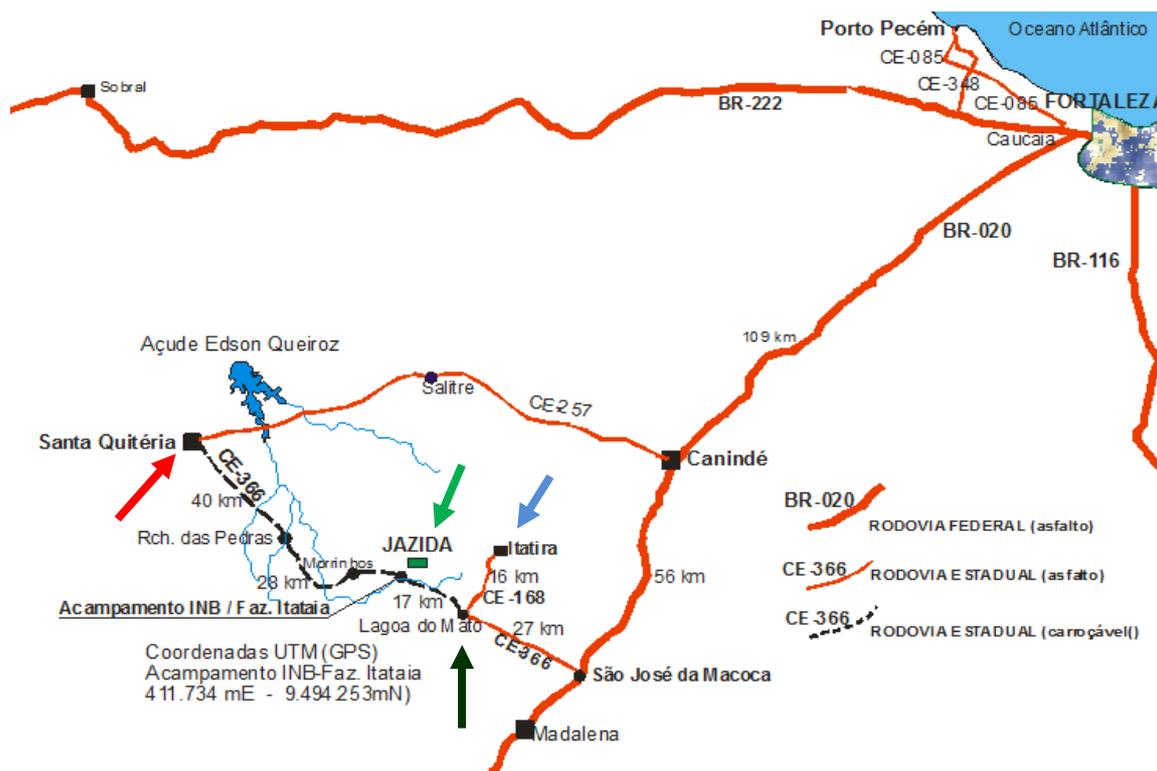


FIGURA 13: Representação esquemática da localização geográfica da Jazida (seta verde), do município de Santa Quitéria (seta vermelha), do município de Itatira (seta azul) e de seu distrito Lagoa do Mato (seta preta). Fonte: Doação da INB-Ceará, 2013.

O Município de Itatira localiza-se no Sertão-Central do Ceará e, de acordo com o Censo 2010 feito pelo IBGE, possui área de 783,35 km² e conta com 18.894 habitantes, sendo 9.589 homens (50,75%) e 9.305 mulheres (49,25%), com uma densidade demográfica em torno de 24,12 hab./km². Em Itatira, 50,04% da população vive na zona urbana, e 49,06% da zona rural. O clima é tropical quente semi-árido; a vegetação caatinga arbustiva densa; taxa de escolarização é 88,86 para ensino fundamental e 45,90 para ensino médio. A ocupação da população baseia-se basicamente em comércio, serviço e administração pública (IPECE, 2015).

1.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto de pesquisa foi submetido através da Plataforma Brasil sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) n°. 05708712.7.0000.5054, que encaminhou ao Comitê de Ética em Pesquisa (COMEP) da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovado em 28 de Agosto de 2012; antes dos inícios dos trabalhos; com as seguintes avaliações dos Riscos e Benefícios:

“A pesquisa apresenta risco mínimo aos sujeitos que participarão do estudo, relativo à coleta do material. O pesquisador aponta como benefício à possibilidade de identificar a presença ou ausência de riscos à saúde humana nos níveis de radiação existente.”

Esta pesquisa foi realizada com dados adquiridos através de amostras de sangue periférico e mucosa bucal coletados e utilizados somente para o que se referia aos objetivos da mesma, sendo as informações apresentadas de forma coletiva, sem qualquer prejuízo para as pessoas envolvidas, principalmente no que diz respeito à menção de nomes de voluntários ou profissionais de saúde envolvidos no atendimento destes.

Os dados se encontram sob a guarda do pesquisador, sendo garantido seu sigilo e confidencialidade (**parecer de aprovação do Comitê de Ética em anexo**).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O trabalho tem como finalidade avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos da exposição humana ao urânio, na reserva natural de urânio localizada no município de Santa Quitéria no Estado do Ceará; a fim de estimar marco zero da população antes exploração do Urânio na região.

2.2. ESPECÍFICOS

- Estabelecer a incidência de dano ao DNA em células mononucleadas de sangue periférico da população pelo Ensaio do Cometa Alcalino (*Single Cell Gel Electrophoresis* ou *Comet assay*) convencional;

- Estabelecer lesões oxidativas no DNA em células mononucleadas de sangue periférico da população através do Ensaio do Cometa Alcalino modificado com o uso das enzimas FPG, Endo III e hOGG1;

- Determinar o nível de oxidação proteica em amostras de sangue periférico da população, através da detecção de proteínas carboniladas;

- Determinar a incidência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal isoladas da população, pelo método do micronúcleo convencional;

- Determinar a incidência de micronúcleos em reticulócitos isolados da população, pelo método do micronúcleo convencional;

- Determinar a incidência de micronúcleos em células mononucleadas de sangue periférico isolados da população, pelo método do micronúcleo convencional;

- Analisar a incidência de aberrações cromossômicas em células mononucleadas de sangue periférico isolados da população, através de técnicas citogenéticas convencionais.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MÉTODOS

3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS

No presente trabalho, a população de Lagoa do Mato, Município de Itatira, foram amostradas, totalizando 91 indivíduos, a estes foram chamados de residentes.

Todos os sujeitos participantes foram esclarecidos acerca dos objetivos da pesquisa, responderam a um questionário em que foram indagados sobre seus hábitos, idade, antecedentes ou qualquer outro fator que pudesse influir no resultado da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) - **anexo**, declarando estar ciente de todos os propósitos do estudo.

Para o grupo controle negativo, foram selecionados 70 voluntários doadores regulares de sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - HEMOCE, obedecendo aos critérios previamente descritos e a estes foram chamados de não-residentes.

3.1.2. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Para o estudo de biomonitoramento, foi utilizado sangue periférico de doadores voluntários, obedecendo aos seguintes critérios:

- Critérios de Inclusão:
 - Morar na região por um ano ou mais na região;
- Critérios de Exclusão:
 - Estar fazendo uso de algum medicamento;
 - Estar com alguma infecção (virótica ou bacteriana);
 - Ter sido submetido a raio-X, tomografia ou qualquer outro procedimento radiológico a menos de 3 meses;
 - Ter feito tratamento quimioterápico ou radioterápico em algum momento da vida.

3.1.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.3.1. COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO

A coleta do material foi feita através de punção venosa por uma profissional (técnica em enfermagem) funcionária do PSF de Lagoa do Mato, nas dependências do próprio local de trabalho da técnica de enfermagem.

No ato da coleta foram utilizados tubos Vacutainer heparinizados e a quantidade de sangue coletada foi de 10mL, tomando todos os cuidados necessários de assepsia e desinfecção da área.

Após a coleta as amostras foram transportadas para o laboratório em recipientes com gelo e processadas dentro de 2h após a coleta.

A amostra obtida foi usada exclusivamente para execução desta pesquisa e os dados obtidos serão encaminhados para revistas especializadas, sendo mantido o sigilo e respeitada a privacidade dos voluntários. Estes poderão a qualquer tempo solicitar informações sobre procedimentos e benefícios relacionados à pesquisa.

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão da Orientadora, Dra. Claudia do Ó Pessoa e do Co-Orientador Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti.

3.1.4. ENSAIO DO COMETA ALCALINO

Neste estudo a análise de dano ao DNA pelo método do cometa alcalino foi conduzida como descrito por Singh *et al.*, (1988) com mínimas modificações (COLLINS, 2004; HARTMANN, SPEIT, 1997).

O desenho experimental do estudo do cometa foi determinado pela proposta da análise levando em consideração a investigação do dano e o mecanismo de reparo. O resultado poderá avaliar se houve ou não um efeito e estimar o tamanho desse efeito.

3.1.4.1. PREPARAÇÃO DA LÂMINAS

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação da agarose de baixo ponto de fusão. Sangue total foi utilizado para tal teste. 10µl de sangue foram embebidos em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas às lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para

solidificação da agarose. Para cada amostra foram confeccionadas e analisadas quatro lâminas.

3.1.4.2. LISE CELULAR

Após solidificação da agarose a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine; a pH 10,0; 1% Triton X 100; 10% DMSO), protegida da luz, e deixada à baixa temperatura (4°C) por no mínimo 1 h.

Modificações do ensaio do cometa alcalino foram realizadas de modo a permitir análises de possíveis lesões oxidativas no DNA. Para isso, logo após o procedimento de lise celular, as lâminas foram incubadas com diferentes endonucleases capazes de reconhecer bases nitrogenadas (purínicas ou pirimídicas) no DNA. Cada lâmina foi incubada com apenas uma única enzima por vez. As endonucleases utilizadas foram: Formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG), uma enzima de reparação de excisão de bases que reconhece e remove uma grande variedade de purinas oxidadas no DNA, Endonuclease III (Endo III), uma timina-glicol-DNA-glicosilase que age via excisão de bases removendo pirimidinas oxidadas, em especial timinas, no DNA e 8-hidroxiguanina glicosilase (hOGG-1) que age via excisão de bases removendo guaninas oxidadas no DNA.

Sucintamente, após a lise celular, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com solução tampão (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, pH 8,0). Após a lavagem, as lâminas foram secadas em ambiente abrigado de luz e em seguida incubadas com as enzimas FPG (70 µL, 35°C, 30 min), Endo III (50 µL, 35°C, 30 min) e hOGG-1 (1:500, 37°C, 40 min) de acordo com as recomendações do fabricante (New England Biolabs Inc., EUA), com pequenas modificações.

3.1.4.3. NEUTRALIZAÇÃO E ELETROFORESE

As lâminas foram removidos da solução de lise e neutralizadas por 15 min. na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5). Em seguida, foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e cobertas com a solução de eletroforese a 4°C (1 mM Na₂-EDTA; 300 mM NaOH; pH > 13) até cobertura total. As lâminas foram incubadas por 20 min para permitir o relaxamento do DNA e a expressão do dano antes da eletroforese. A eletroforese foi conduzida a baixa temperatura, 4°C por 20 min., usando 25 V e corrente de 300 mA. Todos esses passos foram conduzidos na ausência de

luminosidade (a luz causa danos ao DNA). Após eletroforese as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas numa solução tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) durante 5 min, para neutralizar a alcalinidade (Figura 14). Após a corrida em eletroforese as lâminas foram fixadas com etanol a 100%.

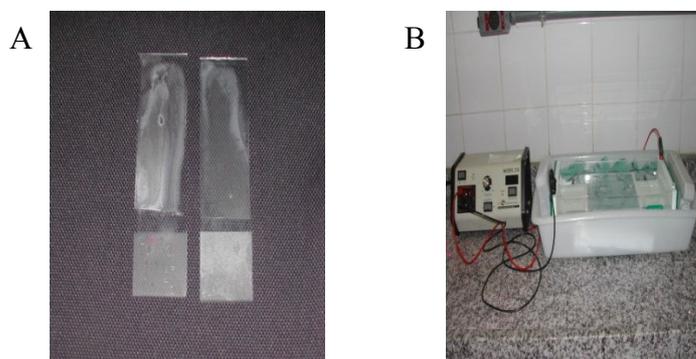


FIGURA 14: Método do Cometa: A – Preparação das Lâminas; B – Eletroforese.

3.1.4.4. ANÁLISE DOS DADOS

Após a fixação das lâminas em etanol 100%, aplicou-se 30 μ L da solução de Brometo de Etídio (20 μ g/mL) e cobriu-se com lamínula para análise em microscópio de fluorescência (Zeiss) equipado com um filtro de excitação de 515–560 nm, um filtro de barreira de 590 nm e objetiva de 40x. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA (Figura 15). Diretrizes e recomendações internacionais para o ensaio do cometa consideram que o escore visual dos cometas é um método de avaliação bem validado, apresentando uma alta correlação com as análises de imagens computadorizadas. Foram contados 100 cometas (100 cometas para cada replicata), que foram classificados de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa. O índice de dano (ID), sendo uma medida sensível de dano baseada na migração do DNA, variou de 0 (Sem dano: 100 células x 0) a 400 (Com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4).

3.1.4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados a partir da média e do desvio-padrão. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 5.0.

- 0 = sem danos (<5%);
- 1 = baixo nível de danos (5 – 20%);
- 2 = médio nível de danos (20 – 40%);
- 3 = elevado nível de danos (40 – 95%);
- 4 = dano total (95%).

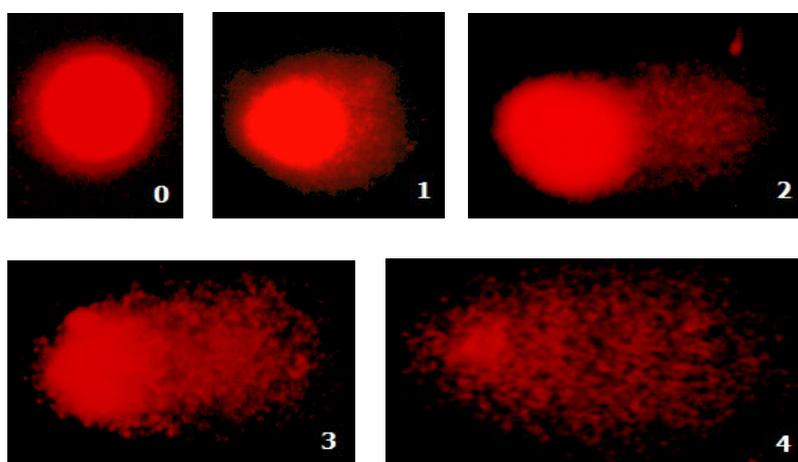


FIGURA 15: Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídio e visualizados no microscópio de fluorescência. (Fonte: Modificada de Speit, Hartmann, 1999).

3.1.5. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Uma grande variedade de agentes é capaz de induzir lesões no DNA celular e quando não são reparadas ou o são de forma inadequada podem resultar em aberrações cromossômicas. Tais aberrações podem ser visualizadas por microscopia óptica quando as células são observadas em metáfase. São denominados clastogênicos os agentes que induzem aberrações cromossômicas estruturais enquanto que aqueles que induzem alterações numéricas são denominados aneugênico, podendo tais agentes ser de natureza química, física ou biológica (LÉONARD, 1990).

A maioria das aberrações cromossômicas (AC) é letal para as células que as carregam ou para as células filhas, mas se não houver perda de material genético, a

célula poderá sobreviver à divisão celular e transmiti-la às gerações futuras (WHO, 1985).

3.1.5.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As preparações metafásicas para a análise convencional de AC foram obtidas seguindo alguns passos: o sangue periférico foi obtido em vacutainers heparinizados. As culturas foram preparadas com 10 gotas de sangue total para cada 5ml de cultura consistindo de 80% RPMI e 20% de Soro Fetal Bovino, antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e estimulados com 2% (de fitohemaglutinina). Os frascos foram mantidos em estufa a 37 °C por 72 horas. Colchicina (0,0016%, Sigma) foi adicionada 2 horas antes da fixação (até 70 horas). Os frascos voltaram para a estufa. As metáfases foram preparadas usando uma técnica modificada de Moorehead *et al.* (1960).

Na seqüência, esse material foi levado para a centrifuga por 5 minutos a uma rotação de 1000 rpm, sendo descartado o sobrenadante, restando 1ml. Adicionou-se 4ml de KCl (0,075%), agitando o material, deixando em banho maria por 20 minutos, visando expandir a membrana celular para liberação e melhor visualização cromossômica. A seguir foi adicionado 0,5ml de fixador (na proporção de 3:1 de metanol para ácido acético a 100%), posteriormente foi realizado uma nova centrifugação a 1000 rpm descartando o sobrenadante, permanecendo 1ml.

Foram realizadas sucessivas centrifugações com posteriores remoções de sobrenadante, até a purificação e limpeza do material cromossômico (com 4 mL de fixador mais ou menos 3 vezes). Na terceira lavagem com o fixador o material foi para geladeira a uma temperatura em torno de 7,5°C, por 1 hora (CONGER, 1953). Em seguida o material foi ressuspenso e levado à centrifuga, retirou-se o sobrenadante e procedeu-se o gotejamento sobre 4 lâminas.

Para a realização da coloração convencional, as lâminas foram coradas com solução Giemsa (Wright) e tampão fosfato (pH = 6,8) na proporção de 1:3 durante 4 minutos. Em seguida lavou-se com água destilada, sendo colocadas para secarem a temperatura ambiente (BACHS *et al.*, 1994) (Figura 15).



FIGURA 16: Sequência esquemática do teste de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico. Fonte: Ramos, 2009.

3.1.5.2. ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com a finalidade de se detectar possíveis alterações cromossômicas estruturais ou numéricas nas metáfases dos linfócitos. Os cromossomos foram analisados com a objetiva de imersão (100 x), em lâminas codificadas, observando-se a posição do centrômero, alterações no grau de ploidia e aberrações estruturais segundo Rabelo-Gay *et. al.*, (1991).

3.1.5.3. CRITÉRIOS DE ANÁLISE

Os parâmetros analisados foram à frequência de células com aberrações cromossômicas em 100 metáfases/cultura e o índice mitótico (IM), determinado pela contagem do número de metáfases em 2000 linfócitos/cultura (Moorhead *et. al.*, 1960). O IM foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{\text{Número de metáfases}}{\text{Número total de linfoblastos}} \times 100$$

3.1.5.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey's ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.1.6. ENSAIO DO MICRONÚCLEO

O ensaio de micronúcleo *in vitro* é hoje um dos testes citogenéticos mais bem estabelecidos, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (Fenech *et al.*, 2000; 2006).

Fenech & Morley (1985) modificaram a metodologia do ensaio empregando a citocalasina B. A citocalasina B é um inibidor da polimerização da actina requerida para a citocinese (Carter, 1967). O uso da citocalasina B induz o bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção das células em divisão (Fenech, 2000).

3.1.6.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ENSAIO DE MICRONÚCLEO EM LINFÓCITOS

O ensaio foi realizado de acordo com Matsuoka *et al.* (1992) com pequenas modificações (Bonacker *et al.*, 2004). Sangue total foram adicionados 10 gotas de sangue para cada 5ml de meio de cultura consistindo de 80% RPMI e 20% de Soro Fetal Bovino, antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina) e estimulados com 2% de fitohemaglutinina. Após 44h de incubação foi adicionada citocalasina B. 28h após, as culturas foram centrifugadas (1000 rpm/5 min) e o sobrenadante desprezado. Posteriormente, as células foram resuspendidas com uma solução hipotônica de KCl (0,075 M) gelada (4°C) por 3 minutos e após, foram fixadas com metanol/ácido acético (3:1) gelado (4°C). Duas a quatro gotas (dependendo da quantidade do material) do material fixado foram transferidas para lâminas de microscopia limpas e depois de secas, estas foram coradas com uma solução de Giemsa (5%) por 7 minutos.

3.1.6.1.1. ANÁLISE DOS DADOS

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio óptico binocular com aumento de 1000 vezes. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Fenech (2000) (Figura 17). Assim, somente células binucleadas (2000 células/voluntário) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o mesmo padrão de coloração foram analisadas.

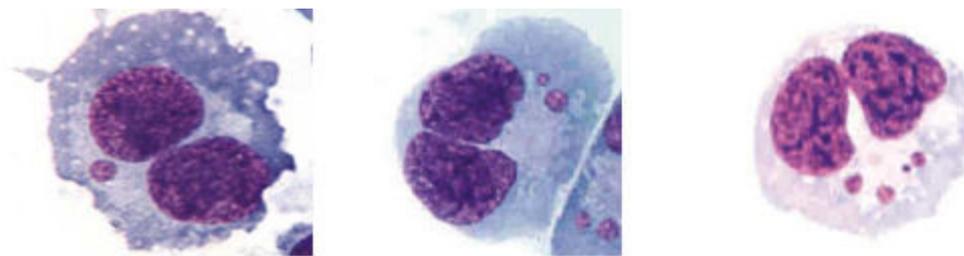


FIGURA 17: Fotomicrografia de linfócitos binucleados portando micronúcleos.
Fonte: Fenech *et al.*, 2003.

3.1.6.1.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey's ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.1.6.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ENSAIO DE MICRONÚCLEO EM RETICULÓCITOS

De acordo com Hayashi *et al* (1990), em uma lâmina pré-tratada com o corante fluorescente acridina laranja (1mg/mL), foram adicionados 50 μ L de sangue periférico dos voluntários. As lâminas foram cobertas com lamínulas para posterior análise.

As preparações celulares foram examinadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência com filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de emissão (barreira) amarelo (575 nm), usando a objetiva de imersão.

Duas mil células (reticulócitos) foram analisadas por indivíduo.

3.1.6.2.1. ANÁLISE DOS DADOS

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio óptico binocular com aumento de 1000 vezes. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram

os descritos por Fenech (2000) (Figura 17). Assim, somente células binucleadas (2000 células/voluntário) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o mesmo padrão de coloração foram analisadas.

3.1.6.2.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de seguido de Tukey's ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.1.6.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ENSAIO DE MICRONÚCLEO EM MUCOSA BUCAL

O material foi obtido mediante raspagem gentil da mucosa bucal, utilizando para tal um *swab*. Com esse raspado foi confeccionado um esfregaço, com a auxílio de uma gota de solução de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) previamente sobre a lâmina. Posteriormente as lâminas foram fixadas em solução metanol/ácido acético 3:1 e após 24 horas as preparações, assim obtidas, foram coradas de acordo com o método de Feulgen e Rossenbeck (1924), e contra-coradas com Fast Green a 1% em álcool absoluto por 1 minuto.

3.1.6.3.1. ANÁLISE DOS DADOS

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio óptico binocular com aumento de 1000 vezes. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Fenech (2000) (Figura 17). Assim, somente células binucleadas (2000 células/voluntário) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o mesmo padrão de coloração foram analisadas.

3.1.6.3.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de seguido de Tukey's ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.1.6.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE OXIDAÇÃO PROTÉICA

A oxidação de proteínas intracelulares foi determinada através da quantificação dos grupamentos carbonilos gerados em cadeias laterais de alguns aminoácidos, utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Buss *et. al.*, 1997). Os leucócitos foram separados através de um gradiente de densidade, com auxílio de Ficoll-Hypaque®, recolhidos e lisados com auxílio de ultrassom. As proteínas presentes no lisado celulares foram quantificadas através do método de Lowry (Lowry *et. al.*, 1951). As amostras de proteína (500 μ l; 1mg/ml) foram incubadas com ou sem solução com DNPH durante 60 min a 37° C no escuro. Após, foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético a 10% (4°C) e incubado por 25 min. Logo após, a suspensão foi centrifugada à 5000 rpm por 30 minutos (4 °C); sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado três vezes com etanol/acetato de etila (1:1, v/v), ressuspendido em solução tampão de 45 mM de Tris-HCl (pH 7,4) e incubado por 10 minutos a 37°C. As proteínas solubilizadas no tampão foram normalizadas pelo teor de proteína (Lowry *et. al.*, 1951) e a absorbância medida com auxílio de espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 375nm (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada). O teor total de proteínas carboniladas foi determinado em nmol/mg de proteína.

3.1.6.4.1. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de seguido de Tukey's ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.2. MATERIAIS UTILIZADOS NA PESQUISA

3.2.1. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS:

- Becker graduado capacidade 50mL;
- Béqueres (SIMAX);
- Caixas para guardar lâminas;
- Câmara umidificada;
- Centrífuga (FANEM);
- Cubas;

- Estante suporte para tubos de centrifuga;
- Estufa de CO₂ (Nuair);
- Fluxo laminar (Pachane);
- Geladeira e freezer (Brastemp);
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Microscópio de fluorescência (Nikon);
- Microscópio óptico binocular (Coleman)
- Pipeta de Pasteur com pipetador;
- Pipeta Sorológica Estéril;
- Pipetas automáticas (Gilson);
- Proveta graduada;
- Seringas descartáveis;
- Seringas descartáveis 10 mL e agulhas 25 x 7;
- Tubo Eppendor - 1,5 mL;
- Tubo falcon 15 ml;
- Tubos de ensaio de vidro (PIREX);
- Tubos para centrifuga 15 mL (Laborglas).

3.2.2. REAGENTES, SOLUÇÕES, LÍQUIDOS E CORANTES

- Ácido acético glacial 100%;
- Agarose 0,5% LMP;
- Agarose 1,5%;
- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Álcool 90%;
- Colchicina (0,0016%);
- DMSO 5%;
- Etanol 100%;
- Ficoll Hystopaque;
- Fitohemaglutinina;
- Gelo;
- Giemsa eosina azul de metileno;
- Heparina Sódica 5000 U/I;
- Meio RPMI 1640;

- Metanol;
- PBS (Tampão Fosfato Salina);
- Solução de Brometo de Etídio (Life technologies);
- Solução de EDTA;
- Solução de Eletroforese;
- Solução de Lise;
- Solução de NaOH;
- Solução KCl;
- Solução Tampão de Neutralização;
- Solução tampão fosfato;
- Soro Fetal Bovino;
- Tripsina.

Outros

- Algodão;
- *Blood stop*;
- Garrote;
- Gazes;
- Luvas descartáveis.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras da população residente foram coletas na Unidade de Saúde Básica João Silva Guerra, localizado no distrito Lagoa do Mato, município de Itatira – **Figura 17**.



FIGURA 18: Foto da Unidade Básica de Saúde, Distrito de Lagoa do Mato, Município de Itatira, Ceará. Fonte: Rodrigues, F.A.R.; 2014.

Como já descrito anteriormente, para o grupo controle negativo (população não residente), as amostras foram adquiridas de voluntários doadores regulares de sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE.

Todas as amostras foram coletas por uma profissional técnica de enfermagem, onde foram seguidos os princípios éticos e todos os procedimentos de biossegurança; garantindo a saúde do doador e dos pesquisadores envolvidos.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Fizeram parte dessa pesquisa 161 (cento e sessenta e um) voluntários, de ambos os sexos, selecionados após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Noventa e um pertenciam ao grupo exposto – chamado de população residente – e 70 indivíduos compuseram o grupo controle – chamado de população não residente.

Após aplicação de questionário foi verificado uma média de idade da população residente de $41,24 \pm 15,00$; com um tempo de exposição, para essa mesma população, de $34,93 \pm 16,06$; conforme a tabela abaixo:

TABELA 2: Características da População Estudada.

Características da amostra	Não Residentes	Residentes
Total	70	91
Idade (anos) \pm E.P.M.	$33,33 \pm 8,88$	$41,24 \pm 15,00$
Faixa (idade mín. e máx.)	19 - 61	18 - 80
Tempo de exposição (anos) \pm E.P.M.	0	$34,93 \pm 16,06$
Intervalo (tempo mín. e máx.)	0	1 - 71
Gênero		
Homens (%)	40,85 ^a	31,86
Mulheres (%)	59,15 ^a	68,14
Estilo de Vida		
Homens		
Bebe / Fuma (%)	0 ^a	44,82
Não bebe / Não Fuma (%)	0 ^a	55,18
Mulheres		
Bebe / Fuma (%)	0 ^a	25,80
Não bebe / Não Fuma (%)	0 ^a	74,20

^aDados coletados no Centro de Hemoterapia do Ceará – HEMOCE.

O tempo de exposição mostrou-se um intervalo de mínimo e máximo amplo devido ao fato da heterogeneidade da população pesquisada; levando em consideração também o fato de incluirmos pessoas com idade avançada; e que eventualmente sempre moraram no local de estudo.

Foram incluídos também, na pesquisa, indivíduos etilistas e fumantes. Para que o estilo de vida não influenciasse nos resultados; todos os parâmetros da pesquisa foram analisados em separado para o grupo de etilista (homens e mulheres) e fumantes (homens e mulheres).

4.3. ENSAIO DO COMETA ALCALINO

Após análise dos dados em relação ao dano de DNA, observado através do ensaio do cometa alcalino, podemos observar que a população residente exposta à ocorrência natural de urânio apresentou, em relação ao grupo não residente (controle), um aumento significativo no índice de dano de DNA ($p < 0,05$), conforme **Figura 19**.

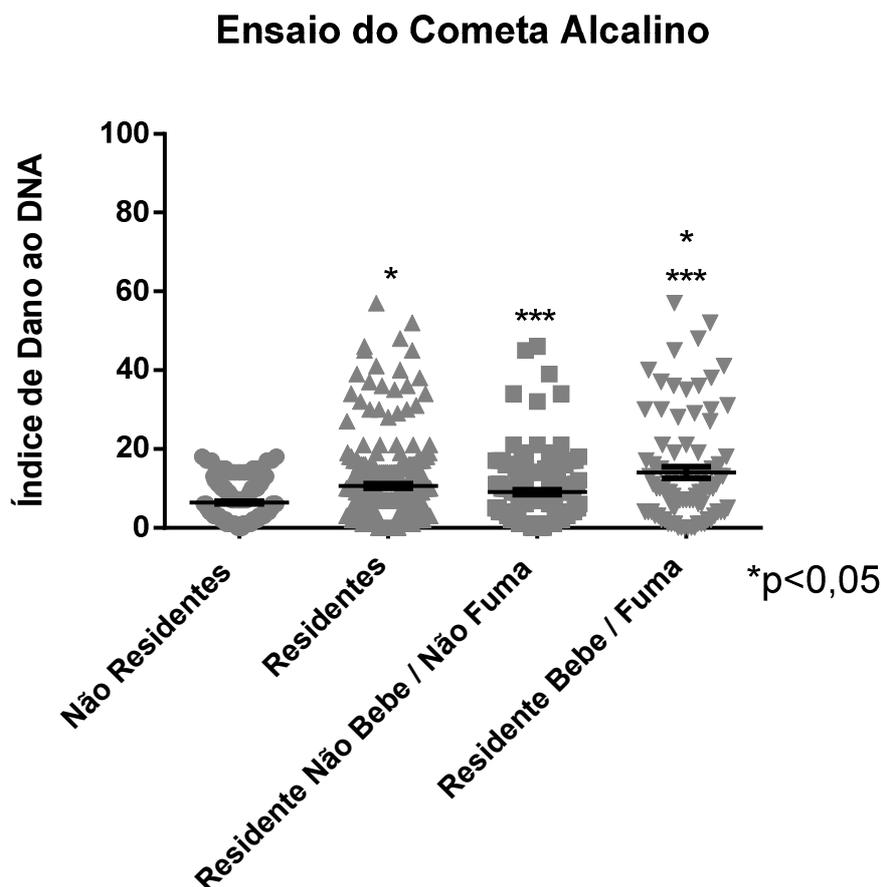


FIGURA 19: Índice de dano ao DNA da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residente ($p < 0,05$); *** valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0,05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Após detalhamento dos dados, podemos observar que o maior índice de dano ao DNA acontece na população residente ($10,63 \pm 0,6151$), no grupo dos homens ($12,87 \pm 1,442$), com uma prevalência bem maior para os homens que são etilistas e/ou fumantes ($19,67 \pm 2,636$); com diferenças significantes, em torno de três vezes mais, em relação à população não residente ($6,348 \pm 0,3191$) – **Tabela 3**. No grupo das mulheres, observamos um aumento significativo no índice de dano ($9,64 \pm 0,6047$); porém sem

aumentos consideráveis no índice de dano em relação ao estilo de vida; como: $9,758 \pm 1,207$ para etilistas e/ou fumantes, e $9,402 \pm 0,7012$ para não etilistas e/ou não fumantes.

TABELA 3: Índice de danos ao DNA da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	Índice de Dano Média \pm SEM
Total	161	$8,770 \pm 0,3863$
Não Residentes	70	$6,348 \pm 0,3191$
Homens	30	$5,989 \pm 0,5008$
Mulheres	40	$6,617 \pm 0,4134$
Residentes	91	$10,63 \pm 0,6151^*$
Não Bebe / Não Fuma	62	$9,043 \pm 0,5601$
Bebe / Fuma	29	$14,03 \pm 1,454^*$
Homens	29	$12,87 \pm 1,442^*$
Bebe/Fuma	13	$19,67 \pm 2,636^*$
Não Bebe / Não Fuma	16	$6,978 \pm 0,6502$
Mulheres	62	$9,64 \pm 0,6047^*$
Bebe/Fuma	16	$9,758 \pm 1,207^*$
Não Bebe / Não Fuma	46	$9,402 \pm 0,7012$

* $P < 0,05$ comparado com o grupo Não Residentes. analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

4.4. ENSAIO DO COMETA ALCALINO COM UTILIZAÇÃO DA ENZIMA FPG

Após análise dos dados em relação ao dano de DNA, utilizando o ensaio do cometa alcalino com a enzima FPG, observamos que o grupo “população residente FPG” exposta à ocorrência natural de urânio apresentou, em relação ao grupo não residente “FPG” (controle), um aumento significativo no índice de dano de DNA ($p < 0,05$), conforme **Figura 20**.

Ensaio do Cometa Alcalino com FPG

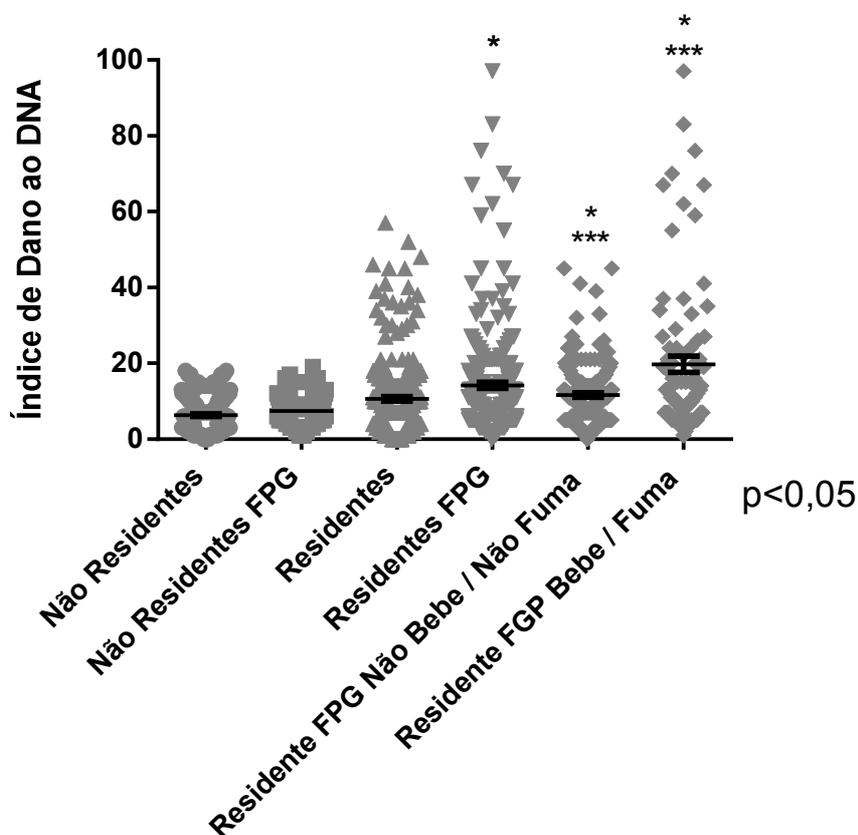


FIGURA 20: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima FPG) da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes FPG ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes FPG não bebem/não fumam e residentes FPG bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Com o detalhamento dos dados, podemos observar que o maior índice de dano ao DNA acontece na população residente FPG ($14,22 \pm 0,8081$), no grupo dos homens ($18,48 \pm 2,171$), com uma prevalência bem maior para os homens que são etilistas e/ou fumantes ($27,51 \pm 4,179$); com diferenças significativas em relação à população não residente FPG ($7,419 \pm 0,2521$) – **Tabela 4**. No grupo das mulheres, observamos um aumento significativo no índice de dano ($12,33 \pm 0,6152$); com aumentos significativos, porém pouco expressivo, no índice de dano em relação ao estilo de vida; como: $13,44 \pm 1,288$ para etilistas e/ou fumantes, e $11,96 \pm 0,6984$ para não etilistas e/ou não fumantes.

TABELA 4: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima FPG) da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	Índice de Dano Média ± SEM
Total	161	11,27 ± 0,4938
Não Residentes	70	7,419 ± 0,2521
Homens	30	7,311 ± 0,3504
Mulheres	40	7,5 ± 0,3554
Residentes	91	14,22 ± 0,8081*
Não Bebe / Não Fuma	62	11,64 ± 0,5580*
Bebe/Fuma	29	19,75 ± 2,128*
Homens	29	18,48 ± 2,171*
Bebe/Fuma	13	27,51 ± 4,179*
Não Bebe / Não Fuma	16	10,64 ± 0,7200
Mulheres	62	12,33 ± 0,6152*
Bebe/Fuma	16	13,44 ± 1,288*
Não Bebe / Não Fuma	46	11,96 ± 0,6984*

*P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Confrontando os dados entre os grupos população residente FPG não etilista e/ou não fumante e população residente FPG etilista e/ou fumante observamos um aumento significativo, em torno de 1,7 vezes, de 11,64 ± 0,5580 para 19,75 ± 2,128; como demonstrado no gráfico da figura 20.

Se compararmos os resultados dos ensaios do cometa alcalino sem (tabela 3) e com a utilização da enzima FPG (tabela 4) observamos um aumento significativo no índice de dano de DNA, em torno de 33,77%, do grupo “população residente” em

relação ao grupo “população residente FPG”; com média de $10,63 \pm 0,6151$ para o grupo “população residente”, e com média de $14,22 \pm 0,8081$ para o grupo “população residente FPG”.

4.5. ENSAIO DO COMETA ALCALINO COM UTILIZAÇÃO DA ENZIMA ENDO III

Em relação ao dano de DNA, utilizando o ensaio do cometa alcalino com a enzima ENDO III, observamos que o grupo “população residente ENDO III” exposta à ocorrência natural de urânio apresentou, em relação ao grupo não residente “ENDO III” (controle), um aumento significativo no índice de dano de DNA ($p < 0,05$), conforme **Figura 21**.

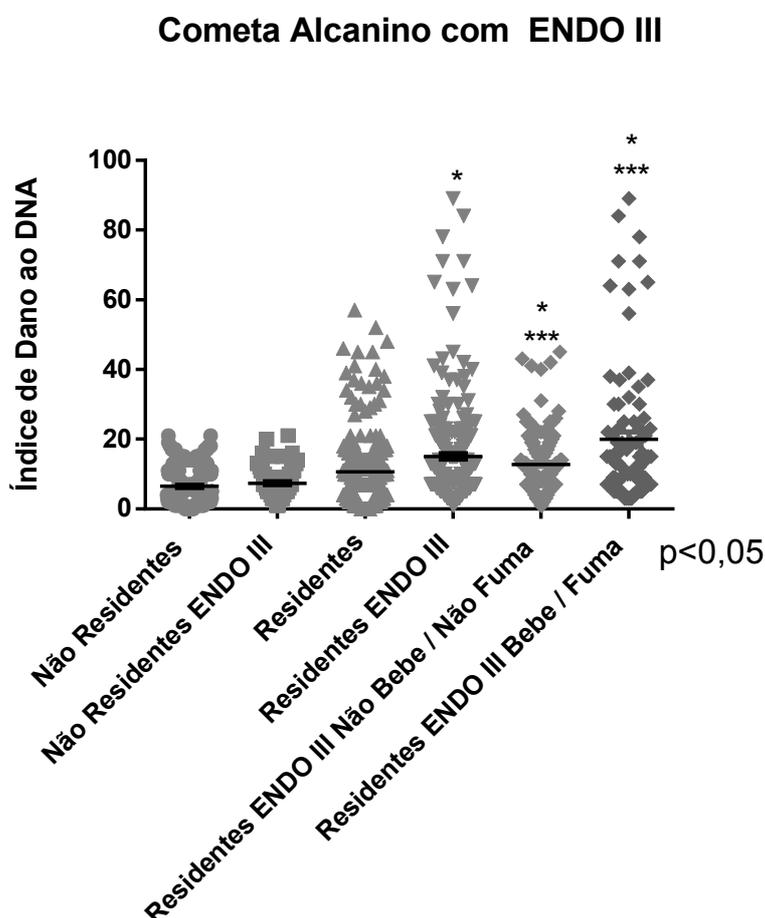


FIGURA 21: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima ENDO III) da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ENDO III ($P < 0.05$); ***valores significantes entre residentes ENDO III não bebem/não fumam e residentes ENDO III bebem/fumam ($p < 0.05$). analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey’s.

Podemos observar também que o maior índice de dano ao DNA acontece na população residente ENDO III ($15,07 \pm 0,8148$), no grupo dos homens ($19,19 \pm 2,193$), com uma prevalência bem maior para os homens que são etilistas e/ou fumantes ($28,64 \pm 4,161$); com diferenças significativas em relação à população não residente ENDO III ($7,281 \pm 0,2500$) – **Tabela 5**. No grupo das mulheres, observamos um aumento significativo no índice de dano ($13,24 \pm 0,6214$); porém sem diferenças significativas entre os grupos relacionados ao estilo de vida; como: $13,33 \pm 0,7203$ para etilistas e/ou fumantes, e $12,96 \pm 1,241$ para não etilistas e/ou não fumantes.

TABELA 5: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima ENDO III) da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	Índice de Dano Média \pm SEM
Total	161	$11,68 \pm 0,5044$
Não Residentes	70	$7,281 \pm 0,2500$
Homens	30	$7,389 \pm 0,4327$
Mulheres	40	$7,2 \pm 0,2948$
Residentes	91	$15,07 \pm 0,8148^*$
Não Bebe / Não Fuma	62	$12,77 \pm 0,5850^*$
Bebe/Fuma	29	$19,99 \pm 2,145^*$
Homens	29	$19,19 \pm 2,193^*$
Bebe/Fuma	13	$28,64 \pm 4,161^*$
Não Bebe / Não Fuma	16	$11,00 \pm 0,8257$
Mulheres	62	$13,24 \pm 0,6214^*$
Bebe/Fuma	16	$13,33 \pm 0,7203^*$
Não Bebe / Não Fuma	46	$12,96 \pm 1,241$

*P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Quando comparamos os grupos população residente ENDO III não etilista e/ou não fumante e população residente ENDO III etilista e/ou fumante observamos um aumento significativo, em torno de 0,6 vezes, de $12,77 \pm 0,5850$ para $19,99 \pm 2,145$; como demonstrado no gráfico da Figura 21. Já a comparação entre os grupos homens ENDO III; vemos um aumento significativo, em torno de 160%, de não etilistas e/ou não fumantes ($11,00 \pm 0,8257$) em relação ao etilistas e/ou fumantes ($28,64 \pm 4,161$).

4.6. ENSAIO DO COMETA ALCALINO COM UTILIZAÇÃO DA ENZIMA HOGG1

Ao realizarmos o ensaio do cometa alcalino com a enzima hOGG1, observamos que o grupo “população residente hOGG1” exposta à ocorrência natural de urânio apresentou, em relação ao grupo não residente “hOGG1” (controle), um aumento significativo no índice de dano de DNA ($p<0,05$), conforme **Figura 22**.

Podemos observar que o maior índice de dano ao DNA acontece na população residente hOGG1 ($14,44 \pm 0,7768$), no grupo dos homens ($18,07 \pm 2,084$), com uma prevalência bem maior para os homens que são etilistas e/ou fumantes ($26,1 \pm 4,064$); com diferenças significativas em relação à população não residente hOGG1 ($7,578 \pm 0,2431$) – **Tabela 6**. No grupo das mulheres, observamos um aumento significativo no índice de dano ($12,83 \pm 0,6033$); com aumentos significantes, porém pouco expressivo, no índice de dano em relação ao estilo de vida; como: $13,02 \pm 1,285$ para etilistas e/ou fumantes, e $12,27 \pm 0,6822$ para não etilistas e/ou não fumantes.

Cometa Alcaninico com hOGG1

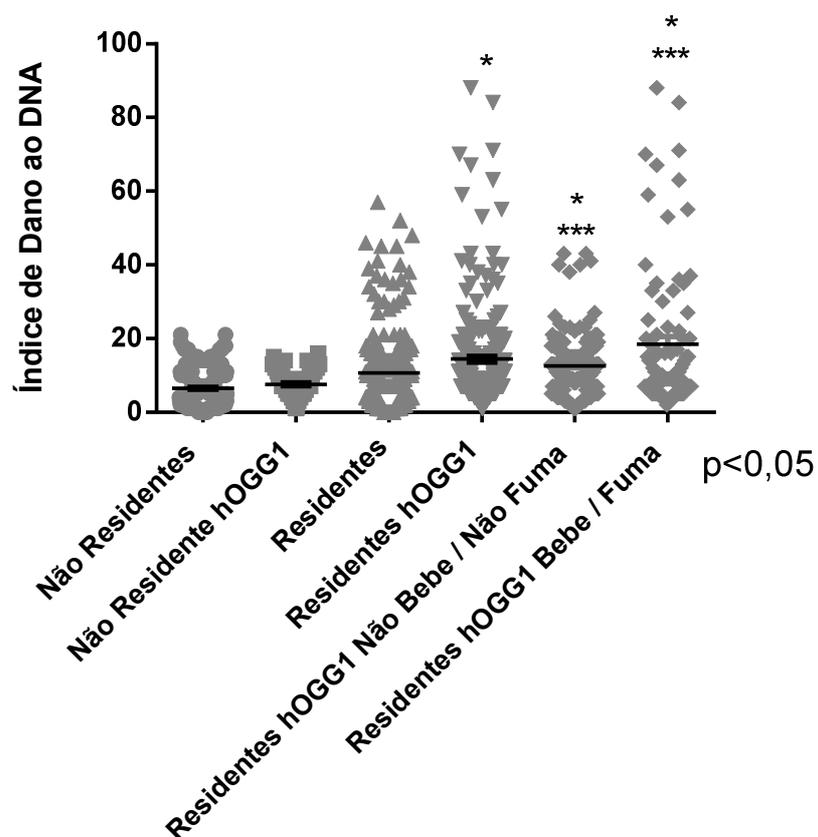


FIGURA 22: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima hOGG1) da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes hOGG1 ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes hOGG1 não bebem/não fumam e residentes hOGG1 bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

TABELA 6: Índice de danos ao DNA (utilizando enzima hGOO1) da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	Índice de Dano Média \pm SEM
Total	161	11,72 \pm 0,5031
Não Residentes	70	7,578 \pm 0,2431
Homens	30	7,578 \pm 0,3447

Mulheres	40	7,358 ± 0,3166
Residentes	91	14,44 ± 0,7768*
Não Bebe / Não Fuma	62	12,56 ± 0,5503*
Bebe/Fuma	29	18,47 ± 2,078*
Homens	29	18,07 ± 2,084*
Bebe/Fuma	13	26,1 ± 4,064*
Não Bebe / Não Fuma	16	11,11 ± 0,7489
Mulheres	62	12,83 ± 0,6033*
Bebe/Fuma	16	13,02 ± 1,285*
Não Bebe / Não Fuma	46	12,27 ± 0,6822

*P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Quando comparamos os grupos população residente hGOO1 não etilista e/ou não fumante e população residente hGOO1 etilista e/ou fumante observamos um aumento significativo, em torno de 0,5 vezes, de 12,56 ± 0,5503 para 18,47 ± 2,078; como demonstrado no gráfico da Figura 22. Já a comparação entre os grupos homens residentes hGOO1; observamos um aumento significante, em torno de 1,3 vezes, de não etilistas e/ou não fumantes (11,11 ± 0,7489) em relação ao etilistas e/ou fumantes (26,1 ± 4,064).

Podemos observar que o índice de dano aumentou significativamente, na população residente, quando realizamos o ensaio do cometa alcalino sob o tratamento com as enzimas FGP, ENDO III, hGOO1 (14,22 ± 0,8081; 15,07 ± 0,8148; 14,44 ± 0,7768; respectivamente) em relação a população residente quando realizamos o ensaio do cometa alcalino sem adição de nenhuma enzima (10,63 ± 0,6151). Com isso, é possível relacionar o dano ao DNA com lesões oxidativas (a 8-oxoG, com uso da enzima hOGG1), de bases púricas (uso FGP) e pirimídicas (uso ENDO III).

4.7. ENSAIO DO MICRONÚCLEOS EM LINFÓCITOS

Os resultados da avaliação mutagênica, com o teste de MN com bloqueio de citocinese, de residentes revelam que a incidência de linfócitos binucleados, com MN, não foi significativamente diferente ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo não residente (Figura 23).

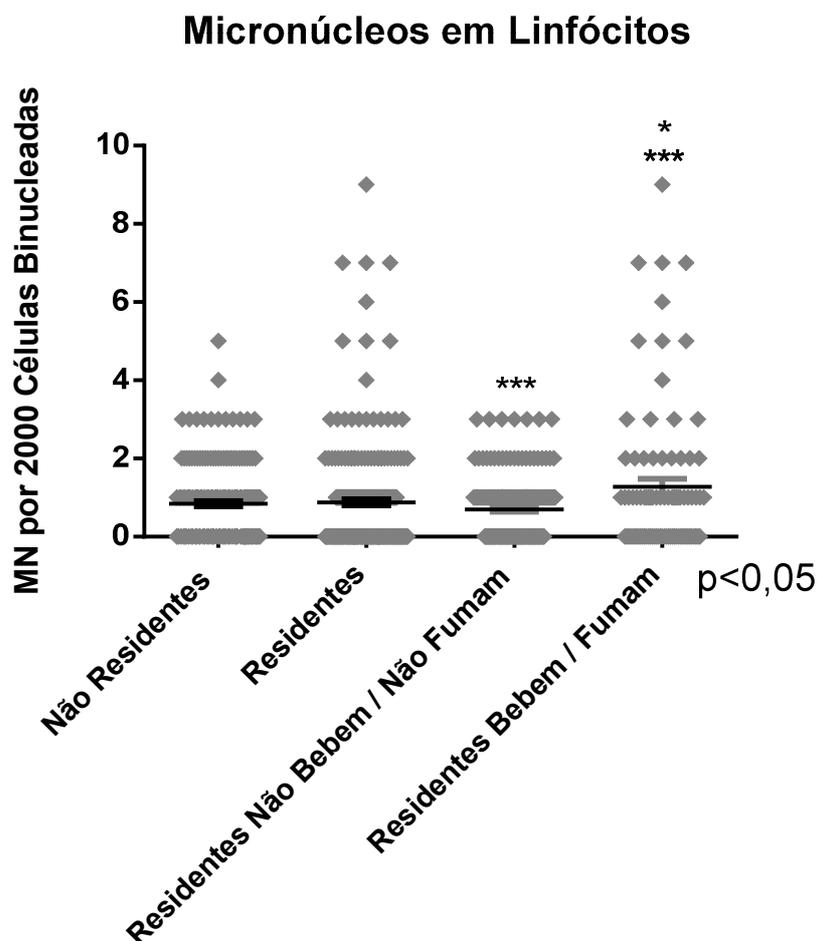


FIGURA 23: Mutagenicidade, avaliado pela incidência de micronúcleos em linfócitos da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ($p < 0,05$); ***valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0,05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Apesar de entre residentes e não residentes não termos encontrado diferenças significativas; a maior incidência de linfócitos binucleados, com MN, foi observado no grupo dos homens ($1,333 \pm 0,2104$), com uma prevalência bem maior, em torno de 1,3 vezes em relação aos não residentes, para os homens que são etilistas e/ou fumantes

(1,949 ± 0,4057), com diferenças significativas em relação à população não residente (0,8476 ± 0,0645) – **Tabela 7**. No grupo das mulheres também não observamos diferenças significativas, mesmo para as mulheres do grupo etilistas e/ou fumantes.

TABELA 7: Mutagenicidade avaliada pelo teste MN em linfócitos da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	MN/2.000 céls. BN[#] Média ± SEM
Total	161	0,8675 ± 0,05233
Não Residentes	70	0,8476 ± 0,0645
Homens	30	0,8778 ± 0,1104
Mulheres	40	0,825 ± 0,07730
Residentes	91	0,8828 ± 0,07821
Não Bebe / Não Fuma	62	0,6989 ± 0,0598
Bebe/Fuma	29	1,276 ± 0,2040*
Homens	29	1,333 ± 0,2104*
Bebe/Fuma	13	1,949 ± 0,4057*
Não Bebe / Não Fuma	16	0,80 ± 0,1371
Mulheres	62	0,6825 ± 0,05834
Bebe/Fuma	16	0,7292 ± 0,1254
Não Bebe / Não Fuma	46	0,6667 ± 0,06575

[#]2000 células por indivíduo, totalizando 322.000 células avaliadas quanto à presença de MN. *P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

4.8. ENSAIO DO MICRONÚCLEOS EM RETICULÓCITOS

Os resultados da avaliação mutagênica, com o teste de MN de residentes revelam que a incidência de reticulócitos, com MN, não foi significativamente diferente ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo não residente (Figura 24).

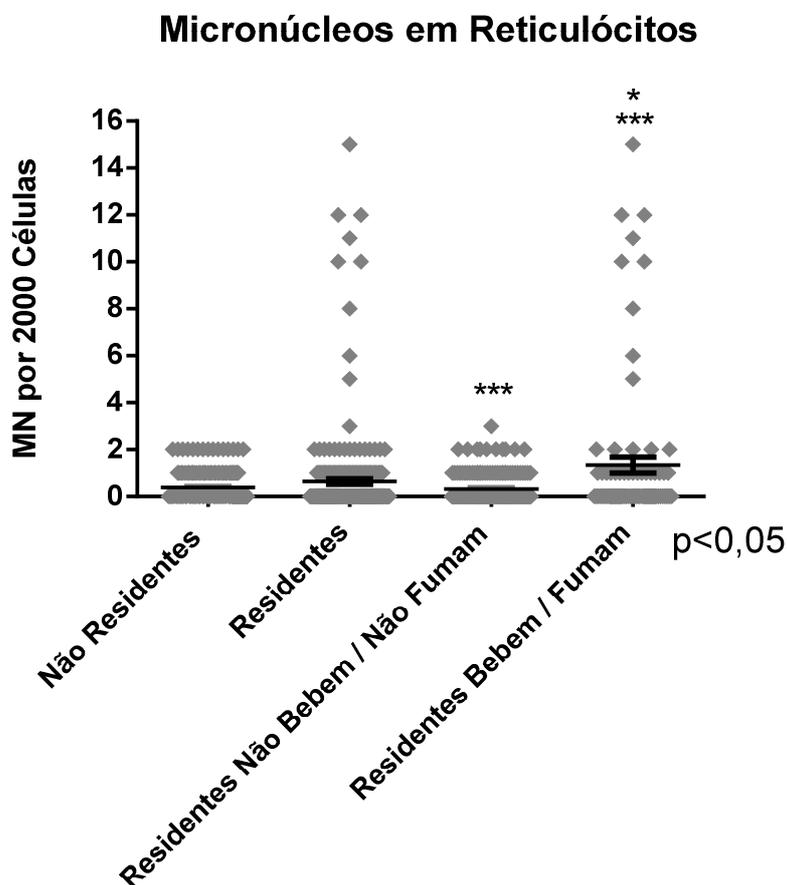


FIGURA 24: Mutagenicidade, avaliado pela incidência de micronúcleos em reticulócitos da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ($p < 0,05$); ***valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0,05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Apesar de entre residentes e não residentes não encontramos diferenças significativas; a maior incidência de reticulócitos, com MN, foi observado no grupo dos homens ($1,226 \pm 0,3501$), com uma prevalência bem maior para os homens que são etilistas e/ou fumantes ($2,41 \pm 0,7073$), com diferenças significativas, em torno de 5,4 vezes, em relação à população não residente ($0,3762 \pm 0,0425$) – **Tabela 8**. No grupo

das mulheres também não observamos diferenças significativas, mesmo para as mulheres do grupo etilistas e/ou fumantes.

TABELA 8: Mutagenicidade avaliada pelo teste MN em reticulócitos da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	MN/2.000 céls. BN[#] Média ± SEM
Total	161	0,5259 ± 0,06736
Não Residentes	70	0,3762 ± 0,04250
Homens	30	0,3111 ± 0,05837
Mulheres	40	0,425 ± 0,05995
Residentes	91	0,6410 ± 0,1142
Não Bebe / Não Fuma	62	0,3172 ± 0,0438
Bebe/Fuma	29	1,333 ± 0,3353*
Homens	29	1,226 ± 0,3501*
Bebe/Fuma	13	2,41 ± 0,7073*
Não Bebe / Não Fuma	16	0,2 ± 0,07521
Mulheres	62	0,381 ± 0,04519
Bebe/Fuma	16	0,4583 ± 0,08912
Não Bebe / Não Fuma	46	0,3546 ± 0,05243

[#]2000 células por indivíduo, totalizando 322.000 células avaliadas quanto à presença de MN. *P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

4.9. ENSAIO DO MICRONÚCLEOS EM MUCOSA BUCAL

Os resultados da avaliação mutagênica, com o teste de MN de residentes revelam que o número de células da mucosa bucal, com MN, não foi significativamente diferente (p<0,05), quando comparado com o grupo não residente (Figura 25).

TABELA 9: Mutagenicidade avaliada pelo teste MN em mucosa bucal da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	MN/2.000 céls. BN[#] Média ± SEM
Total	161	0,5424 ± 0,04956
Não Residentes	70	0,4095 ± 0,04886
Homens	30	0,4778 ± 0,08245
Mulheres	40	0,3583 ± 0,05893
Residentes	91	0,6447 ± 0,07875
Não Bebe / Não Fuma	62	0,4301 ± 0,0492
Bebe/Fuma	29	1,130 ± 0,2163*
Homens	29	1,119 ± 0,2243*
Bebe/Fuma	13	1,897 ± 0,4405*
Não Bebe / Não Fuma	16	0,4444 ± 0,09824
Mulheres	62	0,4339 ± 0,04816
Bebe/Fuma	16	0,4583 ± 0,08912
Não Bebe / Não Fuma	46	0,4255 ± 0,05715

[#]2000 células por indivíduo, totalizando 322.000 células avaliadas quanto à presença de MN. *P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

4.10. ENSAIO DE MENSURAÇÃO DE OXIDAÇÃO PROTÉICA

As mensurações de oxidação protéica de residentes revelam que a dosagem de proteína carbonilada foi significativamente maior (p<0,05), quando comparado os grupos não residente e residente (Figura 26).

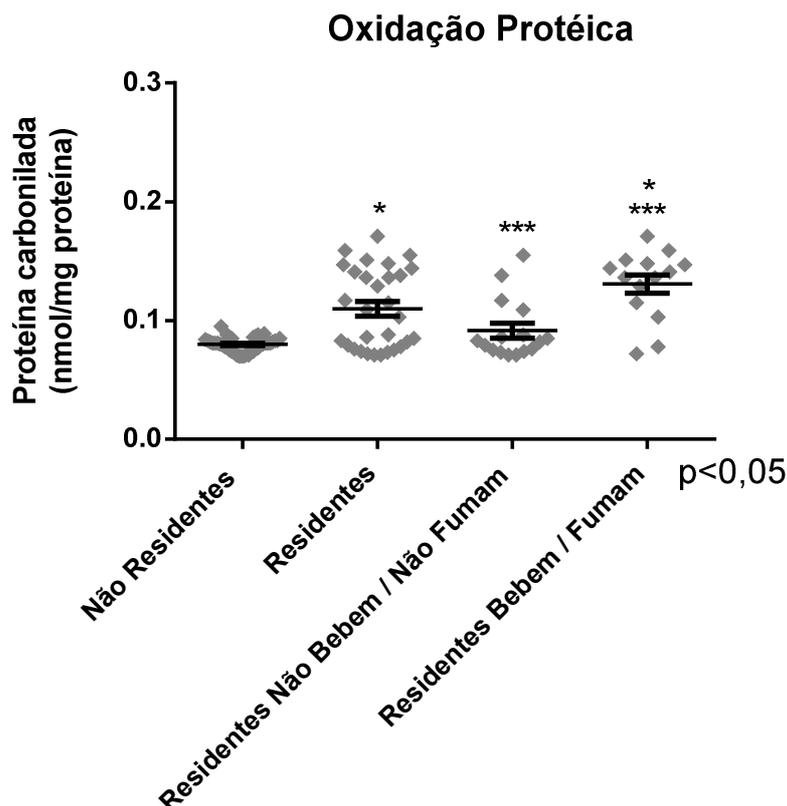


FIGURA 26: Mensuração de Oxidação Protéica da população não residente e residente. *valores significantes em relação ao grupo não residentes ($p < 0.05$); ***valores significantes entre residentes não bebem/não fumam e residentes bebem/fumam ($p < 0.05$). Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Quando comparamos os grupos população residente não etilista e/ou não fumante e população residente etilista e/ou fumante observamos um aumento significativo, em torno de 0,4 vezes, de $0,0913 \pm 0,0063$ para $0,1307 \pm 0,0077$; como demonstrado no gráfico da Figura 26. Já a comparação entre os grupos homens; vemos um aumento significativo, em torno de 0,6 vezes, de não etilistas e/ou não fumantes ($0,0845 \pm 0,0019$) em relação ao etilistas e/ou fumantes ($0,1403 \pm 0,0064$) – Tabela 10.

TABELA 10: Mensuração de Oxidação Protéica da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	ng/mg de Proteína Média \pm SEM
Total	161	$0,1011 \pm 0,0128$

Não Residentes	70	0,0797 ± 0,0009
Homens	30	0,0806 ± 0,0014
Mulheres	40	0,0789 ± 0,0012
Residentes	91	0,1097 ± 0,0060*
Não Bebe / Não Fuma	62	0,0913 ± 0,0063
Bebe/Fuma	29	0,1307 ± 0,0077*
Homens	29	0,1244 ± 0,0083*
Bebe/Fuma	13	0,1403 ± 0,0064*
Não Bebe / Não Fuma	16	0,0845 ± 0,0019
Mulheres	62	0,0969 ± 0,0075
Bebe/Fuma	16	0,1068 ± 0,0184*
Não Bebe / Não Fuma	46	0,0936 ± 0,0083

*P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

4.11. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Os resultados de aberrações cromossômicas da população residente revelam que as frequências de quebras cromossômicas e cromatídicas dos grupos da população residente foram significativamente diferente ($p < 0,05$), quando comparado com aos grupos da população não residente (Tabela 11).

Ao estratificarmos a amostra, observamos que as maiores frequências de aberrações cromossômicas, estatisticamente significantes, estão nos grupos de residentes com estilo de vida etilista e /ou fumantes, em homens e mulheres. Para homens residentes etilistas e/ou fumantes a frequência de quebras cromossômicas e quebras cromatídicas, respectivamente, foram de $0,51 \pm 0,10$ e $0,47 \pm 0,15$, enquanto os não etilistas e/ou não fumantes foi de $0,24 \pm 0,05$ e $0,20 \pm 0,11$. Já para mulheres residentes etilistas e/ou fumantes, a frequência de quebras cromossômicas e quebras cromatídicas, respectivamente, foram de $0,37 \pm 0,05$ e $0,31 \pm 0,10$, enquanto os não etilistas e/ou não

fumantes foi de $0,19 \pm 0,11$ e $0,13 \pm 0,07$. Já a população não residente a frequência de quebras cromossômicas e quebras cromatídicas, respectivamente, foram de $0,12 \pm 0,11$ e $0,11 \pm 0,10$ para homens; e, $0,09 \pm 0,05$ e $0,13 \pm 0,10$ para mulheres.

TABELA 11: Índice mitótico, tipo e frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos da população não residente e residente.

Grupos	Tamanho da Amostra	IM ^a Média ± SEM	Aberrações Estruturais ^b						Aberrações Numéricas ^b
			Quebras Cromossômicas Média ± SEM	Gap Cromossômico Média ± SEM	Quebras Cromatídicas Média ± SEM	Gap Cromatídico Média ± SEM	Cromossomo Dicêntrico Média ± SEM	Endo-rreduplicação Média ± SEM	Poliploidia Média ± SEM
Homens Não Residentes	30	-	-	-	-	-	-	-	-
Não Bebe / Não Fuma	30	4,2 ± 0,22	0,12 ± 0,11	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,10	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,05	0,12 ± 0,01
Homens Residentes	28	-	-	-	-	-	-	-	-
Não Bebe / Não Fuma	15	4,31 ± 0,11	0,24 ± 0,05	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,11	0,10 ± 0,01	-	0,10 ± 0,05	0,16 ± 0,12
Bebe/Fuma	13	4,25 ± 0,16	0,51 ± 0,10*	0,10 ± 0,01	0,47 ± 0,15*	0,11 ± 0,10	0,03 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,05
Mulheres Não Residentes	40	-	-	-	-	-	-	-	-
Não Bebe / Não Fuma	40	4,3 ± 0,10	0,09 ± 0,05	0,15 ± 0,09	0,13 ± 0,10	0,18 ± 0,10	0,01 ± 0,01	0,14 ± 0,10	0,15 ± 0,10
Mulheres Residentes	63	-	-	-	-	-	-	-	-
Não Bebe / Não Fuma	47	4,65 ± 0,56	0,19 ± 0,11	0,11 ± 0,10	0,13 ± 0,07	0,14 ± 0,10	0,01 ± 0,01	0,15 ± 0,11	0,10 ± 0,08
Bebe/Fuma	16	4,48 ± 0,21	0,37 ± 0,05*	0,12 ± 0,10	0,31 ± 0,10*	0,16 ± 0,11	0,01 ± 0,01	0,17 ± 0,12	0,11 ± 0,10

^aÍndice mitótico (2000 células analisadas); ^b150 metáfases analisadas. *P<0,05 comparado com o grupo Não Residentes; Analisado utilizando o teste ANOVA seguido de Tukey's.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Acidentes nucleares catastróficos, como Chernobyl e Fukushima, atraem atenção imediata de pesquisadores devido às enfermidades que milhares de pessoas possam adquirir (Lourenço *et. al.*, 2013; Popp *et. al.*, 2000). No Brasil, em 13 de Setembro de 1987, um acidente radiológico em Goiânia, em que mais de 50 indivíduos foi exposto a doses elevadas de radiação gama, também repercutiu na comunidade científica internacional (Da Cruz *et. al.*, 2008; Da Cruz *et. al.*, 1994; Natarajan *et. al.*, 1991). Diversos recursos são fornecidos para reduzir os efeitos sobre a população afetada; e também para compreender e avaliar os efeitos tóxicos da exposição (Lourenço *et. al.*, 2013).

No entanto, estes tipos de acidentes não são a única fonte de perigos radioativos, uma vez que a exposição crônica a resíduos de mineração de urânio podem causar efeitos negativos na saúde humana (Brugge e Buchner, 2011). Existe um cabedal de artigos publicados onde se demonstra efeitos da radiação externa sobre a saúde da população (Canu *et. al.*, 2008; NRC, 2005); e a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2011) concluiu que "radionuclídeos internos de urânio que emitem partículas alfa são cancerígenos para os seres humanos" (Canu *et. al.*, 2008).

Apesar desse cabedal de artigos, poucos são os estudos que avaliam a ocorrência de efeitos nocivos sobre populações que moram perto de minas antigas e/ou ativas (Brugge e Buchner, 2011; Wagner *et. al.*, 2010; Au *et. al.*, 1995, 1998); demonstrando um investimento bastante defasado sobre o conhecimento real causado pela extração de minérios radioativos. Resíduo de mineração de urânio contém radionuclídeos da cadeia de decaimento do urânio e também metais carcinogênicos (Lourenço *et. al.*, 2013, 2012; Pereira *et. al.*, 2008); que uma vez ingeridos podem exercer efeitos negativos nos níveis molecular, celular, de tecidos e órgãos (Brugge e Buchner, 2011; Brugge *et al.*, 2005; Wagner *et. al.*, 2010). Esses radionuclídeos se depositam em órgãos e tecidos importantes, tornando-se um componente do background radioativo que irradia permanentemente o indivíduo. Então, depois de cessada ou diminuída a exposição externa, o indivíduo continuará exposto ao elemento que foi retido no organismo, que agora se tornará uma fonte interna. Logo, quanto maior a retenção, maior e mais longa será a exposição (Prado, 2007).

A exposição ao urânio ambiental tem sido associada a várias consequências para a saúde, e podem exercer efeitos tóxicos em vários processos fisiológicos importantes,

incluindo a função renal, o desenvolvimento dos ossos e a hematopoese (Brugge e Buchner, 2011; Brugge *et. al.*, 2005; Wagner *et. al.*, 2010). A medula óssea pode ser afetada quando o urânio é sequestrado no tecido ósseo (um dos seus órgãos-alvo), tendo o potencial de alterar a hematopoese (Wagner *et. al.*, 2010). O urânio também pode afetar parâmetros hematológicos indiretamente, agindo sobre os rins e, potencialmente, reduzindo a produção de eritropoietina (Wagner *et. al.*, 2010). A nível molecular, urânio e outros metais também podem induzir instabilidade genômica, afetando a reparação do DNA, a regulação dos fatores de transcrição nuclear, regulação da expressão gênica, a apoptose, o crescimento celular, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e substituindo metais essenciais em vias metabólicas (Goyer *et. al.*, 2004; Leonard *et. al.*, 2004; Wang e Shi, 2001). Todos estes eventos podem levar ao desenvolvimento de doenças genéticas graves, como o câncer.

Para a UNSCEAR, United Nations Scientific Committee of the Effects of Atomic Radiation (Comitê Científico para os efeitos da Radiação Atômica das Nações Unidas), a dose de risco, considerado para todos os cânceres, é de 1×10^{-2} /Sv-ano) (Santos Leal, 2006); enquanto a dose equivalente anual a que uma pessoa está submetida, devido à radiação natural, é em média da ordem de 1mSv (Okuno, 1998). Os limites de dose equivalente efetiva anuais estabelecidos pela norma CNEN NN 3.01 de janeiro de 2005 é de 1 mSv por ano para o público em geral.

Um possível perigo associado a locais com aflorações de material radiativo reside na potencial mobilização e lixiviamento de substâncias químicas através do solo, podendo, conseqüentemente, contaminar as águas subterrâneas e o solo; afetando diretamente a população local (Neves, 2007).

Desde 1988, através do estudo de Angeiras, destaca-se a importância e ocorrência do depósito de urânio de Itaitaia – Santa Quitéria.

Almeida (2011) demonstrou que as concentrações de ^{238}U em ppb (parte por bilhão) para as amostras de solo e água da região mineradora de Santa Quitéria-CE estão dentro dos limites aceitáveis pela Organização Mundial da Saúde. Através dessas análises, destacou que em Santa Quitéria a taxa de dose efetiva é cerca de 2 vezes superior ao que recomenda a CNEN. Entretanto, conclui que isso é característico da região devido à composição do solo; que tem alta concentração dos radionuclídeos naturais, o que as tornaram jazidas de urânio.

Segundo o Relatório de Impacto Ambiental Projeto Santa Quitéria – CE (2014), no diagnóstico radiológico foram analisadas as concentrações de radiação no ar, nas

águas superficiais e subterrâneas, nos solos, na vegetação e nos peixes durante três anos (2011 a 2013). Os valores de radiação encontrados no ar, nos açudes, nos poços, nos sedimentos, na vegetação e nos peixes encontraram-se dentro dos limites estabelecidos para a saúde humana. Esses valores serão considerados como valores da radiação de fundo do local, ou seja, os valores da radiação natural da região.

A associação entre o urânio (e a radiação emitida por esse elemento) e os efeitos químicos e radiológicos em humanos já foi evidenciada em diversos estudos, indicando efeitos genotóxicos através da exposição por esse elemento (Sombra, 2009; Durakovic, 1999). Para avaliar os potenciais efeitos genotóxicos causados pela exposição aos resíduos de mineração de urânio, amostras de sangue coletadas podem ser analisadas pelo teste do cometa. Esta técnica é usada para detectar a presença de rupturas dos filamentos de DNA, que é considerado um indicador sensível da genotoxicidade (Lourenço *et. al.*, 2013; Shugart, 2000).

No presente trabalho, os índices de Dano ao DNA (IDs) observados para a população residente diferiram estatisticamente dos IDs da população não residente. Já quando analisamos os IDs da população não residente com a população residente, considerando o estilo de vida; podemos observar que a população residente que não bebe e não fuma não possui IDs estatisticamente diferente da população residente. Já os IDs da população residente que bebe e fuma difere estatisticamente dos IDs da população não residente. Com isso, podemos evidenciar, segundo os resultados, que o fato de o indivíduo ser etilista e/ou fumante aumenta o número de IDs; já o fato de o indivíduo ser residente não aumenta o IDs.

Guimarães *et. al.*, 2009, 2010 e Sombra *et. al.*, 2009, 2011 estudando indivíduos exposto ao urânio natural, nas cidades de Monte Alegre, Prainha e Alenquer (Norte do Brasil), não encontraram aumento de dano no DNA avaliado pelo teste do cometa alcalino; corroborando com nossos resultados. O teste é usado com confiança na detecção de exposição à radiação ionizante e na previsão de incidência de câncer (Bonassi & Au, 2002).

O hábito de fumar é obviamente um fator adicional que pode provocar mudanças no genoma celular, conforme Ganapathy *et. al.*, 2015 e Husgafvel-Pursiainen, 2004; onde apontam o teste do cometa como sensível para observar IDs induzido por fumo; e demonstra que extrato de fumo (simulando doses a partir de um décimo de cigarro a dez cigarros) induz um aumento dose-dependente em danos no DNA.

Os efeitos toxicogénicos da exposição em longo prazo a doses baixas de radiação, ainda são incertos (Chang *et. al.*, 1999, Miller *et. al.*, 2005). Milacic *et. al.*, 2004 afirma que a exposição de baixos níveis de radiação não tem influência direta sobre a saúde humana, mas descreve que 5-10% dos indivíduos da população possuem radio sensibilidade a qualquer dose de radiação natural; vindo esta, a produzir efeitos biológicos nesses indivíduos.

O stress oxidativo, especialmente as espécies reativas de oxigênio (ROS), podem danificar as macromoléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Reczek & Chandel, 2015; Alexander & Lett, 2014). Danos oxidativos no DNA podem envolver quebras de fita simples ou dupla e formação dos *cross-links* DNA-proteína. Esses danos podem ser detectados através do teste do cometa com a adição das enzimas de reparo endonuclease III (Endo III) e formamidopirimidina N-glicosilase (FPG); que revelam a presença de bases pirimidinas e purinas oxidadas; respectivamente. Já a enzima hOGG1 relaciona à remoção de lesões oxidativas, em particular a 8-oxoG, que produz transversões GC para AT. A hOGG1 reconhece e catalisa a remoção da 8-oxoG da dupla fita do DNA, deixando um substrato para a maquinaria de reparo no DNA, realizado pela via BER (reparo por excisão de base) (von der Lippen, 2015; Collins, 2014; Collins *et. al.*, 2014; Kushwaha *et. al.*, 2011; Mistry & Herbert, 2003). Geralmente, a versão do ensaio do cometa o alcalino (pH > 13) (Singh *et. al.*, 1988) é recomendado, pois detecta um amplo espectro de lesões de DNA. Porém, tem-se modificado o teste de modo a permitir a detecção de danos oxidativos específicos no DNA; com a incubação das enzimas já descritas (Endo III, FPG, hOGG1), após a lise (Valverde e Rojas, 2009; Speit *et. al.*, 2004).

De forma a avaliar o efeito da radiação natural emitida pelo urânio e o dano oxidativo no DNA, combinamos o ensaio do cometa alcalino, com a utilização das enzimas FPG, Endo III e hOGG1. Observamos que, ao utilizarmos a enzima FPG, o IDs da população residente diferiu estatisticamente dos IDs da população não residente. Em relação ao estilo de vida, os IDs para população residente continuam estatisticamente diferentes entre indivíduos que bebem e/ou fuma e indivíduos que não bebem e/ou não fumam, em relação à população não residente. Porém, para indivíduos que bebem e/ou fuma os IDs são bem superiores, cerca de 166% maior. Esse resultado é previsível, uma vez que o uso de enzimas aumenta a sensibilidade do teste (Collins, 2014); e detecta lesões específicas no DNA (Kushwaha *et. al.*, 2011). Podemos observar que o maior número de lesões no DNA aparece nos indivíduos fumantes e/ou etilistas. Fracasso *et.*

al., 2006 analisando linfócitos de fumantes através do teste do cometa com a utilização da enzima FPG, demonstrou altos níveis de sites FGP-sensíveis; indicando que o fumo causa oxidações em bases de DNA. Thorne *et. al.*, 2009 também demonstrou aumento de dano de DNA causado pela exposição à fumaça de cigarro, observando que a célula possui capacidade de reparo; mas dependendo da quantidade e do grau de exposição, esta capacidade pode ser excedida.

Quando utilizamos as enzimas Endo III e hOGG1 encontramos dados bem parecidos com os da enzima FPG. O IDs da população residente diferiu estatisticamente dos IDs da população não residente. Os IDs também aumentaram significativamente entre os indivíduos que bebem e/ou fuma da população residente. Esse aumento, de 75% para Edo III, e de 244% para hOGG1, em relação ao população não residente, indicam um aumento de lesão oxidativa no DNA. Radak *et. al.*, 2005 relacionou aumento nos níveis da enzima hOGG1 em neoplasias tumorais de indivíduos fumantes. Kumar *et. al.*, 2012 avaliando habitantes expostos à excessiva radiação natural (>1mSv/ano) na região de Querala no Sudoeste da Índia, observaram altos níveis de sites ENDO III-sensíveis e hOGG1-sensíveis em relação ao controle; mas quando estratificados de acordo com o tabagismo, um aumento significativo foi observado apenas em fumantes. Destaca ainda que a fumaça do cigarro é conhecido por conter milhares de produtos químicos potencialmente perigosos e é uma fonte bem conhecida de ROS, que causam danos ao DNA e desempenham um papel crucial na carcinogênese.

Os dados de Kumar *et. al.*, 2012 corroboram com os nossos resultados; onde podemos observar que o aumento de IDs na nossa população está associado ao fato de o indivíduo ser etilista e/ou fumante; e não, a princípio, a exposição à radiação natural.

A partir dos dados de Monleau *et al.*, 2006; Thiébault *et al.*, 2007 e os do presente estudo, existe a possibilidade de que o urânio empobrecido em baixas concentrações ou a baixa radiação de urânio natural induza poucas lesões no DNA, as quais podem ser eficientemente reparadas pelas células expostas. Para concentrações maiores, o urânio induz modificações celulares importantes e dano ao DNA, que levam a necrose. Estes resultados são consistentes com a observação de que, após a baixa exposição ao urânio, células renais humanas normais em cultura retornam ao status normal, porém entram em morte celular irreversível após contaminação com altas concentrações (PRAT *et. al.*, 2005).

Conforme já mencionado, a exposição ambiental a agentes metálicos tóxicos induzem uma variedade de respostas celulares por estresse oxidativo e desequilíbrios no

balanço redox das células. É sabido que metais pesados, além de serem tóxicos, persistem no meio ambiente causando estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que sobrecarregam a capacidade de redução da célula, danificando seus componentes (Ercal *et. al.*, 2001; Stohs & Bagchi, 1995). As principais ameaças à saúde humana estão associadas à exposição ao chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio; que tem sido extensivamente estudado. Porém, poucos são os estudos explorando o efeito do urânio no metabolismo oxidativo; que assim como o chumbo, provavelmente induz dano celular por mecanismo semelhante (Tasat *et. al.*, 2012). Ercal *et. al.*, 2001 descreveu esses mecanismos como sendo a formação direta de ROS e o esgotamento do *pool* de antioxidantes celulares. Uma vez formado, as espécies reativas de oxigênio causam, além de outros danos já mencionados, oxidação em proteínas, produzindo muitas vezes grupos carbonila (Dalle-Donne *et. al.*, 2003). O teor de proteína carbonilada é realmente o marcador mais comumente usado para detecção de oxidação de proteínas, sendo mensurado com uso do 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) através de espectrofotometria (Lestaeve *et. al.*, 2015). O acúmulo de carbonilação de proteínas é observado em várias doenças humanas (Dalle-Donne *et. al.*, 2003).

Garmash *et al.*, 2014 irradiando animais na dose de 1 Gy, observou que a quantidade de grupos carbonilas no plasma sanguíneo aumentou em 1,8 vezes; demonstrando que a dosagem de grupamentos carbonilos pode ser usado como bioindicador para exposição a radiação.

Ao dosarmos os grupamentos carbonilas das amostras coletadas, observamos que a quantidade de proteínas carboniladas da população residente aumentou significativamente da quantidade de proteínas carboniladas da população não residente, em torno de 37,6%. Quando estratificados de acordo com o estilo de vida, observamos um aumento significativo apenas em residentes etilistas e/ou fumantes, em torno de 64%, em relação aos não residentes; e em torno de 19% em relação aos residentes. Com isso, podemos evidenciar, segundo os resultados, que o fato de o indivíduo ser etilista e/ou fumante aumenta substancialmente a dosagem de proteínas carboniladas.

Augustyniak *et. al.*, 2015 e Reznick *et. al.*, 1992 destacaram que o cigarro acelera a produção de ROS através do recrutamento e ativação de fagócitos no pulmão; e provoca oxidação de resíduos de aminoácidos incluindo histidina, triptofano, cisteína, prolina, tirosina, metionina, arginina e lisina; gerando resíduos de carbonila. Megson *et. al.*, 2013 demonstraram que a exposição ao cigarro está associada com o aumento das concentrações plasmáticas de marcadores de estresse oxidativo, como a carbonilação de

proteínas. Garmash *et. al.*, 2014 observou, ao administrar íons urânio (UO_2^{2+}) na dose de 0,5µg/g, a quantidade de grupos carbonilas no plasma sanguíneo aumentou em 103% em relação ao controle negativo. Com isso, fica claro que o urânio é capaz de causar oxidação protéica, porém, nossos dados indicam uma maior oxidação protéica em indivíduos etilista e/ou fumantes; e uma menor correlação entre oxidação protéica e exposição ambiental ao urânio de ocorrência natural.

Vários estudos relatam que a exposição ao urânio empobrecido (DU), principalmente entre os participantes da Guerra do Golfo e operações nos Balcãs tem sido relacionado com o aumento do número de leucemias e outros tipos de câncer (Guimarães *et. al.*, 2010; Ibrulj *et. al.*, 2006; Krunic *et. al.*, 2005); que são consequências de alterações genéticas. Sabe-se que a radiação causa danos cromossômicos; como a formação de micronúcleos. Estes são consequência de agentes clastogênicos e aneugênicos, sendo formados a partir de fragmentos ou cromossomos inteiros, que não atingiram os pólos do fuso durante a mitose e permaneceram encapsulados como núcleos separados (Ibrulj *et. al.*, 2006; Krunic *et. al.*, 2005).

O ensaio de micronúcleo utilizando linfócitos periféricos é prático, confiável e fornece informações sobre alterações citogenéticas ocorridas devido à exposição por produtos químicos ou radiação. Embora realizado vários anos após a exposição à radiação, numerosos estudos de danos genéticos em sobreviventes do bombardeio atômico e em trabalhadores de Chernobyl confirmaram que linfócito humano é um modelo biológico confiável para este tipo de investigação (Sinitsky, 2014; Ibrulj *et. al.*, 2006; Krunic *et. al.*, 2005).

O número de micronúcleos em linfócitos observada nos indivíduos não residentes (controle) não foi estatisticamente diferente do número observado nos indivíduos residentes. Provavelmente a emissão do urânio presente na região geográfica onde a população de estudo esta localizada, não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA ou para interferir na montagem das fibras do fuso ou que a radiação emitida é suscetível de reparo pela célula.

Quando estratificados de acordo com o estilo de vida, observamos um aumento significativo no número de MN apenas em residentes etilistas e/ou fumantes, em torno de 50,5%, em relação aos não residentes, e em torno de 44,5% em relação aos residentes. Com isso, podemos evidenciar, segundo os resultados, que o fato de o indivíduo ser etilista e/ou fumante aumenta o número de MN. Autores apontam existir um sinergismo entre a fumaça emitida pelo tabaco e a exposição à radiação emitida pelo radônio (Baías

et. al., 2010; Ramirez, 2000; Balmes e Scannell, 1997); aumentando de 10 a 20 vezes, em comparação com não fumantes, o risco de desenvolver câncer de pulmão (IAEA, 1986). Fumantes que consomem grande número de cigarros por dia e se expõe a baixos níveis de radiação associado à idade, apresentam uma frequência maior de formação de MN, que indivíduos expostos não fumantes ou que consomem pouca quantidade de cigarros por dia (Dias *et. al.*, 2007; Bonassi *et. al.*, 2003; Fenech, 1993).

Alguns autores sugerem, também, a avaliação de micronúcleos em reticulócitos para estudos de biomonitoramento (Stopper *et. al.*, 2005). Reticulócitos são eritrócitos imaturos e, como as hemácias, não apresentam núcleo; sendo chamados assim por causa da malha reticular de RNA ribossômico, visível à microscopia. O tempo médio de maturação dos reticulócitos (RET) é de cerca de quatro dias, sendo que os três primeiros dias ocorrem na medula óssea e nas últimas 24 horas são liberados para a circulação sanguínea (Pierre, 2002). O princípio deste método parte do mecanismo de que quando um eritroblasto se desenvolve para dar origem a um eritrócito policromático (reticulócito), o núcleo principal é expulso e qualquer micronúcleo que tenha sido formado, por alteração no DNA, permanece no citoplasma, onde não deveria existir qualquer material nuclear (Bosquesi, 2013). Existem duas principais vantagens para análises de micronúcleos baseadas em RET: (i) as células sofrerem divisão celular recente; e, portanto, “sofreram” um risco recente de formação de micronúcleos. Isso torna o método bastante eficaz para detectar danos consequentes de exposição recente a agentes mutagênicos. (ii) Como os RET's não possuem núcleos, o uso de técnicas simples de coloração são suficientes para avaliação da amostra (Dertinger *et. al.*, 2007).

Resultados referentes ao número de MN em reticulócitos foram bastante semelhantes aos encontrados em MN de linfócitos. O número de micronúcleos observado nos indivíduos não residentes (controle) não foi estatisticamente diferente do número observado nos indivíduos residentes. Porém, quando analisamos os indivíduos residentes fumantes e/ou etilistas observamos um aumento de 254% no número de MN em relação aos não residentes; e 108% em relação aos residentes não etilistas e/ou não fumantes.

Dertinger *et. al.*, 2007 irradiando (utilizando raios gama - ^{137}Cs) camundongos por 9 semana em doses de 0,125 a 3,0 Gy observou que, em doses abaixo de 1Gy, a frequência de micronúcleos em reticulócitos aumentou de forma dose-dependente; já para doses acima de 1Gy, a frequência de micronúcleos diminuiu com o aumento da dose. Almeida (2011), conforme já descrito anteriormente, levantou uma dose de 2 mSv

para a região; muito abaixo da menor dose (0,125 Gy) utilizada por Dertinger *et. al.*, 2007; que, mesmo nesta dose (0,125 Gy), observou baixas frequências de MN-RET. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados; onde o número de MN-RET população residente com hábito de vida saudável (exposta a radiação) não diferenciou do número de MN-RET da população não residente (não exposta a radiação). Em relação ao aumento do número de MN-RET entre os residentes etilistas e/ou fumantes; podemos citar Marchettia, *et. al.*, 2011; que observou dados parecidos; utilizando camundongos, descreveu o aumento na frequência de MN-RET induzido pela fumaça de cigarro.

Outros tecidos também podem ser utilizados para avaliar a ocorrência de micronúcleos; ainda que a avaliação seja realizada num mesmo organismo. No epitélio bucal, que é um tecido pavimentoso estratificado não queratinizado, a ausência de queratinização significa uma maior permeabilidade, implicando num maior poder de absorção destas células que compõem este tecido. Para o teste de micronúcleo neste sítio, podem ser coletadas para análise amostras celulares oriundas da mucosa jugal e do bordo lateral da língua (Hoshi, 2009; Rosin e Gilbert, 1990). Estudos de biomonitoramento humano vêm utilizando o ensaio de MN a partir de amostras da mucosa oral como uma ferramenta de avaliação toxicológica (Coronas *et. al.*, 2012) por exposição ao Urânio (Sombra, 2009), pesticidas (Paiva, 2011), derivados de petróleo (Djambetova *et. al.*, 2009), bem como hábitos de vida (Proia *et. al.*, 2006; Reis *et. al.*, 2006; Ramirez e Saldanha, 2002).

O número de micronúcleos observado nos indivíduos não residentes (controle) não foi estatisticamente diferente do número observado nos indivíduos residentes. Porém, quando analisamos os indivíduos residentes fumantes e/ou etilistas observamos um aumento de 176% no número de MN em relação aos não residentes; e 163% em relação aos residentes não etilistas e/ou não fumantes. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o número de micronúcleos aumentou apenas em indivíduos etilistas e/ou fumantes. Os pesquisadores Stich e Rosin em 1983 avaliaram a frequência dos micronúcleos em mucosa bucal em indivíduos que fumavam e consumiam bebidas alcoólicas, não encontrando diferenças nas frequências entre fumantes e não fumantes, mas identificaram efeito sinérgico do cigarro e do álcool sobre estas frequências. Porém, 1987, Sarto e colaboradores encontraram diferenças nas frequências de micronúcleos entre fumantes e não fumantes (Ramos, 2009). Lu *et. al.*, 2012; Suhas *et. al.*, 2004 e Wu *et. al.*, 2004 afirmam que o fumo contém quantidades consideráveis de nitrosaminas,

potentes agentes cancerígenos responsáveis pelo aumento da frequência de micronúcleos encontrados em fumantes.

Visto que as aberrações cromossômicas induzidas são resultantes da interação com o DNA, podemos utilizar tais anomalias como indicadores de danos nesta molécula. Ou seja, por meio dos danos cromossômicos podemos avaliar a atividade mutagênica de agentes potencialmente tóxicos. Os linfócitos do sangue circulante de mamíferos são um ótimo sistema para se testar uma substância quanto à sua capacidade em produzir aberrações cromossômicas. A técnica serve também para o monitoramento de populações expostas ambientalmente a substâncias potencialmente tóxicas, seja por razões profissionais, terapêuticas ou por acidente. Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, os linfócitos serviriam como um sistema sentinela para grupos de alto risco (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

Nessa pesquisa, foi utilizado o Teste de Aberrações Cromossômicas (AC), onde foi evidenciada uma ação clastogênica no grupo residentes etilistas e/ou fumantes. A análise citogenética aferiu um aumento significativo na prevalência das frequências de aberrações cromossômicas estruturais no grupo residente. O grupo homens residentes etilistas e/ou fumantes teve um aumento de 112% na frequência de quebras cromossômicas em relação aos homens residentes não etilistas e/ou não fumantes; e 325% em relação aos homens não residentes. O grupo das mulheres residentes etilistas e/ou fumantes teve um aumento de 94% na frequência de quebras cromossômicas em relação às mulheres residentes não etilistas e/ou não fumantes; e 208% em relação as não residente.

Sombra, 2009 e Guimarães, 2009 estudando residentes dos Municípios de Prainha, Monte Alegre e Alenquer no estado do Pará, expostos ao Urânio natural, encontrou que o urânio presente na região geográfica onde a população de estudo está localizada, não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA, interferir na montagem das fibras do fuso e impedir a progressão do ciclo celular. Com isso, inferiu que existe a possibilidade que o urânio empobrecido ou depletado, em baixas concentrações, ou a baixa radiação de urânio natural induza pequenas lesões no DNA, as quais podem ser eficientemente reparadas pelas células expostas. Nossos dados revelam algo parecido, onde o urânio de ocorrência natural na região parece não induzir quebras no DNA. Já quando se adiciona outros fatores, como o fumo e o álcool, já descritos como indutores de AC, observamos um aumento nas lesões; como quebras de cromossomos e quebras cromatídicas.

Prabhavathi *et. al.*, 2000 estudou cento e quinze fumantes que trabalhavam em uma fábrica de combustível nuclear e analisou vários tipos de aberrações cromossômicas. A exposição variou por um período de 1-25 anos; já a idade variou de 23-52 anos. Um total de 94 fumantes e 118 não fumantes que não foram expostos a compostos uranila ou a quaisquer outros agentes mutagênicos conhecidos e que pertenciam ao mesmo grupo de idade formaram o grupo controle. Os resultados mostraram que existe um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas nas fumantes expostos quando comparados com os fumantes do grupo controle. No grupo controle, os fumantes apresentaram uma alta frequência de aberrações cromossômicas quando comparados aos não-fumantes, sugerindo um efeito clastogênico ao fumar. As alterações cromossômicas observadas nos fumantes expostos pode ser devido ao efeito cumulativo do tabagismo e da exposição a compostos de uranila.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A radiação oriunda do Urânio presente na região geográfica onde a população de estudo está localizada, não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA, interferir na montagem das fibras do fuso e impedir a progressão do ciclo celular, o que deve refletir as baixas doses de radiação a que são expostas. Uma possibilidade é que a baixa radiação de urânio natural induza pequenas lesões no DNA, as quais podem ser eficientemente reparadas pelas células expostas. As lesões no DNA, bem como alterações cromossômicas observadas nos fumantes e etilistas expostos pode ser devido ao efeito do tabagismo e/ou etilismo. A conclusão desse trabalho é de suma importância para se determinar como se encontra a população antes do período de exploração do Urânio na região, uma vez que o Governo Federal tem interesse na exploração da região.

Referências

Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVANJA, M. C. R. Biologic damage resulting from exposure to tobacco smoke and from radon: implication for preventive interventions. *Oncogene*, v. 21, p. 7365-7375, 2002.

ALEXANDER, P.; LETT, J.T. Chapter VIII - Effects of Ionizing Radiations on Biological Macromolecules *Comprehensive Biochemistry*, v. 27, p. 267-356, 2014.

ALMEIDA, G. M. Dose de exposição radiométrica no entorno das minas de CAETITÉ – BA e SANTA QUITÉRIA – CE. Dissertação de Mestrado - Pós Graduação em Física da Universidade Federal de Sergipe, Aracajú/SE, 2011.

AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol*, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANGEIRAS, A.G. Geology and Metallogeny of the Northeastern Brazil Uranium-Phosphorus Province emphasizing the Itataia Deposit. *Ore Geology Reviews*, v. 3, p. 211-225, 1988.

ANTUNES, A.C.; MARTINS, V.; CARDOSO, J.; SANTOS, L.; MONTEIRO GIL, O. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose estimation and inter-individual differences in the response to γ -radiation. *Mutation Research*, v. 760, p. 17–22, 2014.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2013). Guia para a condução de Estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

ASAGOSHI, K.; LIU, Y.; MASAOKA, A.; LAN, L.; PRASAD, R.; HORTON, J.K.; BROWN, A.R.; WANG, X.; BDOUR, H.M.; SOBOL, R.W.; TAYLOR, J.S.; YASUI,

A.; WILSON, S.H. DNA Polymerase β -dependent Long Patch Base Excision Repair in Living Cells. *DNA repair*, v. 9, p. 109-119, 2010.

ATSDR. Toxicological profile for uranium. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia. 462 pp. 1999.

AU, W. W.; SIERRA-TORRES, C. H.; CAJAS-SALAZAR, N.; SHIPP, B. K.; LEGATOR, M. S. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environmental Health Perspectives*, v. 107, p. 501–515, 1999.

AU, W.W.; LANE, R.G.; LEGATOR, M.S.; WHORTON, E.B.; WILKINSON, G.S.; GABEHART, G.J. Biomarker monitoring of a population residing near uranium mining activities. *Environ. Health Perspect*, v. 103, p. 466-470, 1995.

AU, W.W.; MCCONNELL, M.A.; WILKINSON, G.S.; RAMANUJAM, V.M.S.; ALCOCK, N. Population monitoring: experience with residents exposed to uranium mining/milling waste. *Mutat. Res.*, v. 405, p. 237-245, 1998.

AUGUSTYNIAK, E.; ADAM, A.; WOJDYLA, K.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; WILLETTS, R.; KORKMAZ, A.; ATALAY, M.; WEBER, D.; GRUNE, T.; BORSA, C.; GRADINARU, D.; CHAND BOLLINENI, R.; FEDOROVA, M.; GRIFFITHS, H.R. Validation of protein carbonyl measurement: A multi-centre study. *Redox Biol.*, v. 4, p. 149-57, 2015.

AZQUETA, A.; ARBILLAGA, L.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; COLLINS, A. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*, v. 28, p. 1-7, 2013.

BACHS. O.; AGELL, N.; CARAFOLI, E. Calmodulin and calmodulinbinding proteins in the nucleus. *Cell Calcium*, v. 16, p. 289-296, 1994.

BAIAS, P.F.; HOFMANN, W.; WINKLER-HEIL, R.; COSMA, C.; DULIU, O.G. Lung dosimetry for inhaled radon progeny in smokers. *Radiat Prot Dosimetry*, v. 138, p. 111–118, 2010.

BAILEY, M.R.; BERAL, V.; CLAYTON, B.; DARBY, S.C.; GOODHEAD, D.T.; HENDRY, J.H. The health hazards of depleted uranium munitions. (2001). Disponível em: <<https://royalsociety.org/policy/publications/2001/health-uranium-munitions-i/>>. Acesso em 05 jan. 2015.

BALMES, J.R.; SCANNELL, C.H. Pulmonary effects of firefighting. *Occup Med.*, v. 10, p. 789-801, 1995.

BARDELLI, A.; CAHILL, C.P.; LEDEREL, G.; SPEICHER, M.R.; KINZLER, K.W.; VOLGELSTEIN, B.; LENGAUER, C. Carcinogen-specific Induction of Genetic Instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 5770–5775, 2001.

BARTKOVA, J.; HOREJSI, Z.; KOED, K.; KRAMER, A.; TORT, F.; ZIEGER, K.; GULDBERG, P.; SEHESTED, M.; NESLAND, J.M.; LUKAS, C.; ONTOFT, T.; LUKAS, J.; BARTEK, J. DNA Damage Response as a Candidate Anti-cancer Barrier in Early Human Tumorigenesis. *Nature*, v. 434, p. 864-870, 2005.

BEM, H.; BOU-RABEE, F. Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. *Environment International*, v. 30, p. 123-134, 2004.

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, v.21, p. 167-223, 2001.

BLEISE, A.; DANESI, P. R.; BURKART, W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *Journal of Environmental Radioactivity*, v.64, p. 93–112, 2003.

BONASSI, D.; UGOLINI, M.; KIRSCH-VOLDERS, U.; STRÖMBERG, R.; VERMEULEN, J.; TUCKER, D. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospective. *Environmental and*

Molecular Mutagenesis, v. 45, p. 258–270, 2005.

BONASSI, S.; AU, W. W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. Mutation Research, v. 511, p. 73–86, 2002.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.P.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. Mutat Res., v. 543, p. 155-66, 2003.

BRIANEZI, G. Desenvolvimento de um método de análise digital para o Teste do Cometa corado pela prata. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Faculdade De Medicina - Campus De Botucatu, 2011.

BRUGGE, D.; BUCHNER, V. Health effects of uranium: new research findings. Rev Environ Health, v. 26, p. 231-49, 2011.

BRUGGE, D.; DE LEMOS, J.L.; OLDMIXON, B. Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review. Rev. Environ. Health (N.Y.), v. 20, p. 177-193, 2005.

BUSS, H.; CHAN, T.P.; SLUIS, K.B.; DOMIGAN, N.M.; WINTERBOURN, C.C. Protein carbonyl measurement by a sensitive Elisa method. Free Radic Biol Med, v. 23, p. 361–366, 1997.

CAMARGO, I.M.C.; MAZZILLI, B. Estimativa de risco devido à ingestão de isótopos de urânio em fontes de águas minerais. Rev Saude Publica, v. 32, p. 317-320, 1998.

CHAING, C.; TSAI, Y.; BAU, D.; CHENG, Y.; TSENG, S.; WANG, R.; TSAI, F. PTERYGIUM AND GENETIC POLYMORPHISMS OF THE DNA REPAIR ENZYMES XRCC1, XPA, AND XPD. Molecular Vision, v. 16, p. 698-704, 2010.

CHANG, W.P.; HSICH, W.A.; CHEN, D.P.; LIN, Y.P.; HWANG, J.S.; HWANG, J.J.; TSAI, M.H.; HWANG, B.J. Change in centromeric and acentromeric micronucleus

frequencies in human populations after chronic radiation exposure. *Mutagenesis*, v. 14, p. 427-432, 1999.

CHAUDHRY, M. A. Biomarkers for human radiation exposure. *Journal of Biomedical Science*, v. 15, p. 557–563, 2008.

CNEN. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. (2015). Apostila Educativa Radioatividade. Rio de Janeiro, RJ. Disponível em: <<http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2015.

COLLINS, A.; DUSINSKA, M.; FRANKLIN, M. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ. Mol. Mutagen*, v. 30, p. 139–146, 1997.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutation Research*, v. 759, p. 27–39, 2014.

COLLINS, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1840, p. 794–800, 2014.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.*, v. 26, p. 249-261, 2004.

CONGER, A. Culture of pollen tubes for chromosomal analysis at the pollen tube division. *Stain Technology*, v. 28, p. 289-293. 1953.

CORONAS, M.V.; ROSSATO, J.M.; SALVADORI, D.M.F.; VARGAS, V.M.F. Ensaio de micronúcleo com células da mucosa oral para biomonitoramento de crianças expostas a poluentes atmosféricos. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Porto de Galinhas – PE, 2012.

COSTA, C.; TEIXEIRA, J.P. Efeitos genotóxicos dos pesticidas. *Rev. de Ciências Agrárias*. v. 35, p. 19-31, 2012.

Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual. Technical Reports Series No. 405 International Atomic Energy Agency, Vienna, 2001.

DA CRUZ, A.D.; DE MELO E SILVA, D.; DA SILVA, C.C.; NELSON, R.J.; RIBEIRO, L.M.; PEDROSA, E.R.; JAYME, J.C.; CURADO, M.P. Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents 19 years after the Cesium-137 accident. *Mutat Res.*, v. 652, p. 175-179, 2008.

DA CRUZ, A.D.; MCARTHUR, A.G.; SILVA, C.C.; CURADO, M.P.; GLICKMAN, B.W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutation Research*, v. 313, p. 57-68, 1994.

DAVID, S.S.; O'SHEA, V.L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, v.447, p.941-50, 2007.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, v. 329, p. 23-38, 2003.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, v. 521, p. 121–135, 2002.

DE BOER, J.; HOEIJMAKERS, J.H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, v. 21, p.453-60, 2000.

DECORDIER, I.; PAPINE, A.; PLAS, G.; ROESEMS, S.; VANDE, LOOCK K.; MORENO-PALOMO, J.; CEMELI, E.; ANDERSON, D.; FUCIC, A.; MARCOS, R.; SOUSSALINE, F.; KIRSCH-VOLDERS, M. Automated image analysis of cytokinesis-

blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring. *Mutagenesis*, v. 24, p. 85-93, 2009.

DEHON, G.; CATOIRE, L.; DUEZ, P.; BOGAERTS, P.; DUBOIS, J. Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles. *Mutation Research*, v. 650, p. 87-95, 2008.

DETINGER, S.D.; TSAI, Y.; NOWAK, I.; HYRIEN, O.; SUN, H.; BEMIS, J.C.; TOROUS, D.K.; KENG, P.; PALIS, J.; CHEN, Y. Reticulocyte and micronucleated reticulocyte responses to gamma irradiation: dose-response and time-course profiles measured by flow cytometry. *Mutat Res.*, v. 634, p. 119-125, 2007.

DIAS DA CUNHA, K.M.; HENDERSON, H.; THOMSON, B.M; HECHT, A.A. Ground water contamination with (238)U, (234)U, (235)U, (226)Ra and (210)Pb from past uranium mining: cove wash, Arizona. *Environ Geochem Health*, v. 36, p. 477-487, 2014.

DIAS, F.L.; ANTUNES, L.M.G.; REZENDE, P.A.; CARVALHO, F.E.S.; SILVA, C.M.D.; MATHEUS, J.M. Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Environ Toxicol Pharmacol.*, v. 23, p. 228-233, 2007.

DJAMBETOVA, P.M.; SYCHEVA, L.P.; MOLOCHAEVA, L. G.; MAHTIEVA, A.B. Assessment of influence of petroleum pollutions of soils on the cytogenetic status and indexes of apoptosis in the cells of buccal epithelium of children. *Ecological Genetics*, v. 7, p. 34-40, 2009.

DURAKOVIAE, A. Medical effects of internal contamination with uranium. *Croat Med J*, v. 40, p. 49-66, 1999.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, v. 23, p.191-205, 2008.

EL HAGE CHAHINE, J.M.; HÉMADI, M.; HA-DUONG, N.T. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochim Biophys Acta*, v.1820, p. 334-347, 2012.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top.Med. Chem.*, v. 1, p. 529–539, 2001.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Uranium in foodstuffs, in particular mineral water: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, v. 1018, p. 1-59, 2009.

FARMER, P.B. AND SINGH, R. Use of DNA adducts to identify human health risk from exposure to hazardous environmental pollutants: the increasing role of mass spectrometry in assessing biologically effective doses of genotoxic carcinogens. *Mutation Research*, v. 544, p. 397-402, 2008.

FAUST, F., KASSIE, F., KNASMULLER, S., KEVEKORDES, S. AND MERSCH SUNDERMANN, V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. *Toxicology*, v. 198, p. 341–350, 2004.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutation Research*, v. 600, p. 58–66, 2006.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect.*, v. 3, p. 101–107., 1993.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the

cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v. 534, p. 65–75, 2003.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project - an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.*, v. 428, p. 271–83, 1997.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.*, v. 147, p. 29-36, 1985.

FOLHA ONLINE. Urânio do CE deve começar a ser explorado. (2007). Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro/fi2611200705.htm>>. Acesso em 15 jan. 2015.

FRACASSO, M.E.; DORIA, D.; FRANCESCHETTI, P.; PERBELLINI, L.; ROMEO, L. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicology Letters*, v. 167, p. 131–141, 2006.

GANAPATHY, V.; RAMACHANDRAN, I.; RUBENSTEIN, D.A.; QUEIMADO, L. Detection of in vivo DNA damage induced by very low doses of mainstream and sidestream smoke extracts using a novel assay. *Am. J. Prev. Med.*, v. 48, p. 102-110, 2015.

GAO (United States General Accounting Office). Gulf War illness. Understanding of health effects from DU evolving but safety training needed. GAO/NSIAD-00–70, 2000.

GARMASH, S.A.; SMIRNOVA, V.S.; KARP, O.E.; USACHEVA, A.M.; BEREZHNOV, A.V.; IVANOV, V.E.; CHERNIKOV, A.V.; BRUSKOV, V.I.; GUDKOV, S.V. Pro-oxidative, genotoxic and cytotoxic properties of uranyl ions. *J Environ Radioact.*, v. 127, v. 163-170, 2014.

GAVRILESCU, M.; PAVEL, L. V.; CRETESCU, I. Characterization of soil contaminated with uranium. *J. Hazard. Mater.*, v.163, p. 475-510, 2009.

GOMES, A.J.P.; CRUZ, P.R.; BORGES, L.P. Recursos Minerais Energéticos: Carvão e Urânio. Capítulo IX, p. 577-601. In *Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil*. CPRM, Brasília, 2003.

GOYER, R. Issue paper on the human health effects of metals, US Environmental Protection Agency, 44pp., 2004.

GUERRA, A.T. Dicionário Geológico – Geomorfológico. Fundação IBGE, 3ª edição, 1990.

GUIMARÃES, A.C. Avaliação dos efeitos carcinogênicos e genotóxicos do urânio como indicador de risco à saúde de residentes dos municípios de Monte Alegre, Prainha e Alenquer no Estado do Pará. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará. Belém/PA, 2009.

GUIMARÃES, A.C.; ANTUNES, L.M.; RIBEIRO, H.F.; DOS SANTOS, A.K.; CARDOSO, P.C.; DE LIMA, P.L.; SEABRA, A.D.; PONTES, T.B.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; SOMBRA, C.M.; BAHIA, M DE O.; BURBANO, R.R. Cytogenetic biomonitoring of inhabitants of a large uranium mineralization area: the municipalities of Monte Alegre, Prainha, and Alenquer, in the State of Pará, Brazil. *Cell Biol Toxicol.*, v. 26, p. 403-419, 2010.

GUO, R.; CHEN, J.; MITCHELL, D.L.; JOHNSON, D.G. GCN5 and E2F1 Stimulate Nucleotide Excision Repair by Promoting H3K9 Acetylation at Sites of Damage. *Nucleic Acids research*, v. 39, p. 1390-1397, 2011.

HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I.L.; KNUDSEN, L.E.; LINDHOLM, C.; NORPPA, H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Research*, v. 64, p. 2258–2263, 2004.

HAHN, F.F.; GUILMETTE, R.A.; HOOVER, M.D. Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats. *Environ. Health Perspect.*, v. 110, p. 51–59, 2002.

HANAHAN, D., WEINGERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARLEY, N.H. Toxic effects of radiation and radioactive materials. In Caserett and Doull's. *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Ed. By Curtis D. Klassen. 6th Ed. McGraw Hill International Edition, USA. Pp.917-944. 2001.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*, v. 90, p. 183-188, 1997.

Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, v. 245, p. 245-249, 1990.

HOFFMANN, H. AND SPEIT, G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research*, v. 581, p.105–114, 2005.

HORE-LACY, I. (2015) Uranium. In: *Encyclopedia of Earth*, Washington, D.C. Disponível em: <<http://www.eoearth.org/article/Uranium>>. Acesso em: 01 jan. 2015.

HOSHI, L. Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: Uso do teste de micronúcleo na mucosa oral. Fundação Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Dissertação de Mestrado. 2009.

IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Ionizing Radiation, Part I, X- and Gamma-Radiation and Neutrons. LYON, FRANCE, 26 May– 2 June 1999. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, p. 1–448, 2000.

IBRULJ, S.; HAVERIĆ, S.; HAVERIĆ, A.; DURMIĆ-PASIĆ, A.; MARJANOVIĆ, D. Effect of war and postwar genotoxins on micronuclei frequency in Sarajevo study group. *Bosn J Basic Med Sci.*, v. 6, p. 54-57, 2006.

ICRP. "Age-Dependent Doses To Members of the Public from Intake of Radionuclides: Part 3, Ingestion dose coefficients." ICRP Publication 69. International Commission on Radiological Protection. Pergamon Press, Oxford, 1995.

INB. INDÚSTRIAS NUCLEARES DO BRASIL. (2015). Reservas - Brasil e Mundo. Rio de Janeiro, RJ. Disponível em: <http://www.inb.gov.br/pt-br/WebForms/interna.aspx?secao_id=48>. Acesso em 05 jan 2015.

INB. INDÚSTRIAS NUCLEARES DO BRASIL. Disponibilidade do urânio, exploração, comercialização e sustentabilidade da geração núcleo-elétrica no Brasil - Alfredo Trajan Filho. (2008). Disponível em: <http://lasans.org.br/pdf/2008/Institucional%20INB_junho%202008%20Alfredo%20Trajan.pdf> Acesso em 20 de jan. 2015.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, in: *Biological Dosimetry*. Technical reports series N° 260. IAEA, Vienna, Austria, 1986.

IPECE. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. (2015). Perfil Básico Municipal 2014 – Itatira. Fortaleza, CE. Disponível em: <http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/perfil_basico/pbm-2014/Itatira.pdf>. Acesso em 15 jan. 2015.

KAPKA-SKRZYPCZAK, L.; CYRANKA, M.; SKRZYPCZAK, M.; KRUSZEWSKI, M. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure - state of the art. *Ann Agric Environ Med*, v. 8, p. 294-303, 2011.

KASAHARA, S. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009.

KNUDSEN, L.E.; HANSEN, A.M. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational Health. *Int J Hyg Environ Health*, v. 210, p. 461-70, 2007.

KONIETZKA, R. Gastrointestinal absorption of uranium compounds - A review. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 71, p. 125-133, 2015.

KOPPEN, G.; VERHEYEN, G.; MAES, A.; VAN GORP, U.; SCHOETERS, G.; HOND, E.D.; STAESSEN, J.; NAWROT, T.; ROELS, H.A.; VLIETINCK, R.; VERSCHAEVE, L. A battery of DNA effect biomarkers to evaluate environmental exposure of Flemish adolescents. *Journal of Applied Toxicology*, v. 27, p. 238–246, 2007.

KRUNIĆ, A.; HAVERIĆ, S.; IBRULJ, S. Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arh Hig Rada Toksikol.*, v. 56, p. 227-232, 2005.

KUMAR, P.R.; CHERIYAN, V.D.; SESHADRI, M. Evaluation of Spontaneous DNA Damage in Lymphocytes of Healthy Adult Individuals from High-Level Natural Radiation Areas of Kerala in India. *Radiation Research*, v. 177, p. 643-650, 2012.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. *Pathology Basis of Disease*, 7th edn., WB Saunders, China, 1552p., 2004.

KURTTIO, P.; AUVINEN, A.; SALONEN, L.; SAHA, H.; PEKKANEN, J.; MÄKELÄINEN, I.; VÄISÄNEN, S.B.; PENTTILÄ, I.M.; KOMULAINEN, H. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect*, v. 110, p.337-342, 2002.

KUSHWAHA, S.; VIKRAM, .; TRIVEDI, P.P.; JENA, G.B. Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research*, v. 726, p. 242-250, 2011.

LEAL, T.C.S. Avaliação dos Efeitos Mutagênicos em Um Bioindicador Decorrentes das Taxas de Dose de Radiação Junto a Depósitos de Rejeitos Radioativos. Tese de Doutorado - Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

LEGRAND, M.; CHAN, C.L.; JAUERT, P.A.; KIRKPATRICK, D.T. Analysis of Base Excision and Nucleotide Excision Repair in *Candida Albicans*. *Microbiology*, v. 154, p. 2446-2456, 2008.

LEONARD, S.S., BOWER, J.J., SHI, X. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol. Cell. Biochem*, v. 255, p. 3-10, 2004.

LESTAEVEL, P.; DHIEUX, B.; DELISSEN, O.; BENDERITTER, M.; AIGUEPERSE, J. Uranium modifies or not behavior and antioxidant status in the hippocampus of rats exposed since birth. *J Toxicol Sci.*, v. 40, p. 99-107, 2015.

LITTLE JOHN, B. Ionizing Radiation. In: *Cancer Medicine*. Bast Jr, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R.; Holland, J.F.; Frei, E. 5th edition. Ed. B.C. Decker Inc. 2400 pp, 2000.

LORENZO, Y.; COSTA, S.; COLLINS, A.R.; AZQUETA, A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, v. 28, p. 427-432, 2013.

LOURENÇO, J.; PEREIRA, R.; PINTO, F.; CAETANO, T.; SILVA, A.; CARVALHEIRO, T.; GUIMARÃES, A.; GONÇALVES, F.; PAIVA, A.; MENDO, S. Biomonitoring a human population inhabiting nearby a deactivated uranium mine. *Toxicology*, v. 305, p. 89-98, 2013.

LOURENÇO, J.; PEREIRA, R.; SILVA, A.; CARVALHO, F.; OLIVEIRA, J.; MALTA, M.; PAIVA, A.; GONÇALVES, F.; MENDO, S. Evaluation of the sensitivity of genotoxicity and cytotoxicity endpoints in earthworms exposed in situ to uranium mining wastes. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v. 75, p. 46-54, 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUO, J.; SOLIMINI, L.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*, v.136, p. 823-837, 2009.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. Low paraoxonase in Persian Gulf War veterans self-reporting Gulf War syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 276, p. 729–733, 2000.

MARCHETTIA, F.; ROWAN-CARROLL, A.; WILLIAMS, A.; POLYZOS, A.; BERNDT-WEISB, M.L.; YAUKB, C.L. Sidestream tobacco smoke is a male germ cell mutagen. *PNAS*, v. 208, p. 12811–12814, 2011.

MCCARTHY, P.J.; SWEETMAN, S.F.; MCKENNA, P.G.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, v. 12, p. 209-214, 1997.

MEGSON, I.L.; HAW, S.J.; NEWBY, D.E.; PELL, J.P. Association between exposure to environmental tobacco smoke and biomarkers of oxidative stress among patients hospitalised with acute myocardial infarction. *PLoS One*, v. 8, p. 1-5, 2013.

MELLIER, G.; HUANG, S.; SHENOY, K.; PERVAIZ, S. TRAILing death in cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, v.31, p.93-102, 2010.

MILACIC S, PETROVIC D, JOVICIC D, KOVACEVIC R, SIMIC J. Examination of the health status of populations from depleted-uranium-contaminated regions. *Environmental Research*, v. 95, p. 2-10, 2004.

MILLER, A.C.; BELTRAN, D.; RIVAS, R.; STEWART, M.; MERLOT, R.J.; LISON, P.B. Radiation and depleted uranium-induced carcinogenesis studies: characterization of the carcinogenic process and development of medical countermeasures. *NATO RTG-099*. 2005.

MILLER, A.C.; BLAKELY, W.F.; LIVENGOOD, D.; WHITTAKER, T.; XU, J.; EJNIK, J.W.; HAMILTON, M.M.; PARLETTE, E.; JOHN, T.S.; GERSTENBERG, H.M.; HSU, H. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium–uranyl chloride. *Environ. Health. Perspect*, v. 106, p. 465–471, 1998.

MILLER, A.C.; BROOKS, K.; STEWART, M.; ANDERSON, B.; SHI, L.; MCCLAIN, D.; PAGE, N. Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J. Environ. Radioact*, v. 64, p. 247–259, 2003.

MILLER, A.C.; STEWART, M.; RIVAS, R. DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia. *Biochimie*, v. 91, p. 1328-1330, 2009.

MISTRY, P.; HERBERT, K.E. Modulation of hOGG1 DNA repair enzyme in human cultured cells in response to pro-oxidant and antioxidant challenge. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 35, p. 397-405, 2003.

MØLLER, P.; HEMMINGSEN, J.G.; JENSEN, D.M.; DANIELSEN, P.H.; KAROTTKI, D.G.; JANTZEN, K.; ROURSGAARD, M.; CAO, Y.; KERMANIZADEH, A.; KLINGBERG, H.; CHRISTOPHERSEN, D.V.; HERSOUG, L.G.; LOFT, S. Applications of the comet assay in particle toxicology: air pollution and engineered nanomaterials exposure. *Mutagenesis*, v. 30, p. 67–83, 2015.

MONLEAU, M.; DE MÉO, M.; PAQUET, F.; CHAZEL, V.; DUMÉNIL, G.; DONNADIEU-CLARAZ, M. Genotoxic and Inflammatory Effects of Depleted Uranium Particles Inhaled by Rats. *Toxicological Sciences*, v. 89, p. 287–295, 2006.

MOOREHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, v. 20, p. 613-616, 1960.

MORELLO-FROSCH, R.; VARSHAVSKY, J.; LIBOIRON, M.; BROWN, P.; BRODY, J.G. Communicating results in post-Belmont era biomonitoring studies: Lessons from genetics and neuroimaging research. *Environmental Research*, v. 136, p. 363-372, 2015.

MORETTI, M.; GROLLINO, M.G.; PAVANELLO, S.; BONFIGLIOLI, R.; VILLARINI, M.; APPOLLONI, M.; CARRIERI, M.; SABATINI, L.; DOMINICI, L.; STRONATI, L.; MASTRANGELO, G.; BARBIERI, A.; FATIGONI, C.; BARTOLUCCI, G.B.; CERETTI, E.; MUSSI, F.; MONARCA, S. Micronuclei and chromosome aberrations in subjects occupationally exposed to antineoplastic drugs: a multicentric approach. , v. 2, 2014.

MORI, T.; ANAZAWA, Y.; IIZUMI, M. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene*, v. 25, p. 2914-2918, 2002.

NATARAJAN, A.T.; VYAS, R.C.; WIEGANT, J.; CURADO, M.P. A cytogenetic follow-up study of the victims of a radiation accident in Goiania (Brazil). *Mutation Research*, v. 247, p. 103-111, 1991.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation. *Biological Effects of Ionizing Radiations (BEIR VII) Report, phase II*. Washington, DC: National Academy Press; 2005.

NEVES, M.F.J.V. Avaliação do potencial genotóxico de uma mina de urânio abandonada. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 2007.

NEWMAN, M.C. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 1998.

NRC (National Research Council). *Review of the toxicologic and radiologic risks to military personnel from exposures to depleted uranium during and after combat*. Washington, DC: The National Academies Press; 2008.

OECD. THE ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. (2015). 474 - MAMMALIAN ERYTHROCYTE MICRONUCLEUS TEST. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948442.pdf>>. Acesso em 12 jan. 2015.

OKUNO, E. Radiação Efeitos, Riscos e Benefícios. Harbra, São Paulo, 1998.

OLIVEIRA, L.U.; LIMA, C.F.; SALGADO, M.A.; BALDUCCI, I.; ALMEIDA, J.D. Comparative study of oral mucosa micronuclei in smokers and alcoholic smokers. *Anal Quant Cytol Histol.*, v. 34, p. 9-14, 2012.

PAIVA, J.C.G.; CABRAL, I.O.; SOARES, B.M.; SOMBRA, C.M.L.; FERREIRA, J.O.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C. Biomonitoring genetic of farmers exposed to pesticides in the municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceará, Brazil). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, p. 492-501, 2011.

PELLMAR, T. C., FUCIARELLI, A. F., EJNIK, J. W., HAMILTON, M., HOGAN, J., STROCKO, S., EMOND, C., MOTTAZ, H. M. AND LANDAUER, M. R. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol. Sci.*, v. 49, p. 29–39, 1999.

PEREIRA, R.; ANTUNES, S.C.; MARQUES, S.M.; GONÇALVES, F. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I Soil chemical characterization. *Sci. Total Environ.*, v. 390, p. 377–386, 2008.

PIERRE, R. V. Reticulocytes: their usefulness and measurement in peripheral blood. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 22, p. 63-79, 2002.

POPP, W.; PLAPPERT, U.; MÜLLER, W.U.; REHN, B.; SCHNEIDER, J.; BRAUN, A.; BAUER, P.C.; VAHRENHOLZ, C.; PRESEK, P.; BRAUKSIEPE, A.; ENDERLE, G.; WÜST T, BRUCH, J.; FLIEDNER, T.M.; KONIETZKO, N.; STREFFER, C.; WOITOWITZ, H.J.; NORPOTH, K. Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study. *Radiat Environ Biophys*, v. 39, p. 275-82, 2000.

PRABHAVATHI, P.A.; FATIMA, S.K.; RAO, M.S.; REDDY, P.P. Analysis of chromosomal aberration frequencies in the peripheral blood lymphocytes of smokers exposed to uranyl compounds. *Mutat Res.*, v. 466, p. 37-41, 2000.

PRADO, G. R. Estudo de contaminação ambiental por urânio no município de Caetité-Ba, utilizando dentes humanos como bioindicadores. Dissertação de mestrado - UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2007.

PRAT, O.; BÉRENGUER, F.; STEINMETZ, G.; RUAT, S.; SAGE, N.; QUÉMÉNEUR E. Alterations in gene expression in cultured human cells after acute exposure to uranium salt: Involvement of a mineralization regulator. *Toxicol In Vitro*, v. 24, p. 160–168, 2010.

PROIA, N.K.; PASZKIEWICZ, G.M.; NASCA, M.S.S.; FRANKE, G.E.; PAULY, J.L. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer-A review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent.*, v. 15, p. 1061-1077, 2006.

RABELO-GAY, M. N.; RODRIGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagêneses, Carcinogêneses e Teratogêneses. Métodos e Critérios de Avaliação. *Revista Brasileira de Genética*, São Paulo: FCA, p. 83-90, 1991.

RADAK, Z.; GOTO, S.; NAKAMOTO, H.; UDUD, K.; PAPAI, Z.; HORVATH, I. Lung cancer in smoking patients inversely alters the activity of hOGG1 and hNTH1. *Cancer Letters*, v. 219, p. 191–195, 2005.

RAMIREZ, A. Análise de células metanucleadas de alcoólicos portadores de carcinomas orais. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências (USP), São Paulo, 2000.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet. Mol. Res.*, v. 1, p. 246-260, 2002.

RAMOS, M. E. S. P. Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, Município de Conceição do

Jacuípe, Bahia. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, CE, 2009.

REIS, S.R.A.; SANTO, A.R.E.; ANDRADE, M.G.S.; SADIGURSKY, M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Braz. Oral Res.*, v. 20, p. 97-102, 2006.

RELATÓRIO DE IMPACTO AMBIENTAL PROJETO SANTA QUITÉRIA (2014). Disponível em: <http://www.inb.gov.br/pt-br/WebForms/Download.aspx?file=RIMA_Santa_Quiteria.pdf&att=true>. Acesso em 12 fev. 2015.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, M. F.; MARQUES, E.K. *Mutagenesis Ambiental*, v. 356 p. 2003.

RIEGER, P.T. The Biology of Cancer Genetics. *Seminars in Oncology Nursing*, v.20, p.145-154, 2004.

ROSIN, M.P.; GILBERT, A. Modulation of genotoxic effect in humans, in: M.L. Mendelson, R.I. Albertini (Eds.), *Mutation and the Environment, Part E*. Wiley, New York, NY, pp. 351–359, 1990.

SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Reparação de DNA em células eucarióticas. In: *Genética Toxicológica*. Org. Juliana da Silva, Bernardo Erdtmann, João Antonio Henriques Pegas, Porto Alegre: Editora: Alcance, p. 271-305, 2003.

SCHRÖDER, H.; HEIMERS, A.; FRENTZEL-BEYME, R.; SCHOTT, A.; HOFFMANN, W. Chromosome aberration analysis in peripheral lymphocytes of Gulf War and balkans war veterans. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 103, p. 211-219, 2003.

SHAHAM, J.; KAUFMAN, Z.; GURVICH, R.; LEVI, Z. Frequency of sister-chromatid among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutation Research*, v. 491, p. 71-80, 2001.

SHUGART, L.R. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, v. 9, p. 329–340, 2000.

SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; HEUSER, V.; MARINHO, J.R.; ERDTMAN, B. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 270-278, 2000.

SINGH, I.S.; JAISWAL, D.D.; NAIR, S.; VIJAYAGOPAL, P.; BHATI, S.; GARG, S.P. Comparison of observed body retention of uranium in natural condition in an average Indian adult with the values predicted by the ICRP biokinetic model. *Radiat Prot Dosimetry*, v. 131, p. 425-430, 2008.

SINGH, M.P.; MCCOY, M.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. *Exp. Cell Res*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v. 175, p. 184–191, 1998.

SINITSKY, M.Y. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Peripheral Blood Lymphocytes as a Prospective Biological Test-System to Estimate the Influence of Radon on the Human Organism: Recent Progress and Future Prospects. *Open Journal of Genetics*, v. 4, 2014.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, v. 531, p.231-251, 2003.

SOMBRA, C.M.L.; CAVALCANTI, B.C; DE MORAES, M.O.; SANTOS, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.; BURBANO, R.R; PESSOA, C. Genetic biomonitoring of inhabitants exposed to uranium in the north region of Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 74, p. 1402-1407, 2011.

SOMBRA, C.M.L. Biomonitoramento genotóxico e genético como indicador de risco à saúde por exposição ao urânio de residentes dos Municípios de Monte Alegre, Prainha e Alenquer no Estado do Pará. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza, Ce, 2009.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, v. 113, p. 203-212, 1999.

SPEIT, G.; SCHÜTZ, P.; BONZHEIM, I.; TRENZ, K.; HOFFMANN, H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters*, v. 146, p. 151-158, 2004.

SPENCER, H.; OSIS, D.; FISENNE, I.M.; PERRY, P.M.; HARLEY, N.H. Measured intake and excretion patterns of naturally occurring ²³⁴U, ²³⁸U, and calcium in humans. *Radiat Res*, v. 124, p. 90-95, 1990.

STOHS, S.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, v. 18, p. 321-36, 1995.

STRAND, L.A.; MARTINSEN, J.I.; BORUD, E.K. Cancer risk and all-cause mortality among Norwegian military United Nations peacekeepers deployed to Kosovo between 1999 and 2011. *Cancer Epidemiology*, v. 38, p. 364–368, 2014.

STRANO, S.; DELL'ORSO, S.; DI AGOSTINO, S.; FONTEMAGGI, G.; SACCHI, A.; BLANDINO, G. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*, v. 26, p. 2212–2219, 2007.

SUHAS, S.; GANAPATHY, K.S.; GAYATRI DEVI, M.; RAMESH, C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat Res.*, v. 561, p. 15-21, 2004.

TASAT, D.R.; ORONA, N.S.; BOZAL, C.; UBIOS, A.M.; CABRINI, R.L. Intracellular Metabolism of Uranium and the Effects of Bisphosphonates on Its Toxicity. In: Cell Metabolism – Cell Homeostasis and Stress Response, p. 115-148, 2012.

THIÉBAULT, C.; CARRIÈRE, M.; MILGRAM, S.; SIMON, A.; AVOSCAN, L.; GOUGET, B. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicological Sciences*, v. 98, p. 479–487, 2007.

THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiation accidents. *Ann Ist Super Sanità*, v. 45, p. 260-264, 2009.

THORNE, D.; WILSON, J.; KUMARAVEL, T.S.; MASSEY, E.D.; MCEWAN, M. Measurement of oxidative DNA damage induced by mainstream cigarette smoke in cultured NCI-H292 human pulmonary carcinoma cells. *Mutation Research*, v. 673, p. 3-8, 2009.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; Y; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, v. 35, p. 206-221, 2000.

UMEGAKI, K.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*, v.15, p. 261–269, 2000.

URNOVITZ, H.B.; TUIITE, J.J.; HIGASHIDA, J.M.; MURPHY, W.H. RNAs in the sera of Persian Gulf War veterans have segments homologous to chromosome 22q11.2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 6, p. 330–335, 1999.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of Oxygen Radicals in DNA Damage and Cancer Incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research*, v. 681, p. 93–109, 2009.

VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva J., ERDTMANN B & HENRIQUES J. A.P. (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre. p. 147-163, 2003.

VOISIN, P.; BARQUINERO, F.; BLAKELY, B.; LINDHOLM, C.; LLOYD, D.; LUCCIONI, C.; MILLER, S.; PALITTI, F.; PRASANNA, P.G.; STEPHAN, G.; THIERENS, H.; TURAI, I.; WILKINSON, D.; WOJCIK, A. Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, v. 48, p. 501-504, 2002.

VON DER LIPPEN, C.; SAHU, S.; SEIFERMANN, M.; TIWARI, V.K.; EPE, B. The repair of oxidized purines in the DNA of human lymphocytes requires an activation involving NF- κ B-mediated upregulation of OGG1. *DNA Repair*, v. 25, p. 1-8, 2015.

WAGNER, S.E.; BURCH, J.B.; BOTTAI, M.; PINNEY, S.M.; PUETT, R.; PORTER, D.; VENA, J.E.; HÉBERT, J.R. Hypertension and hematologic parameters in a community near a uranium processing facility. *Environ. Res.*, v. 110, p. 786-797, 2010.

WANG, E.; ZAMAN, N.; MCGEE, S.; MILANESE, J.S.; MASOUDI-NEJAD, A.; O'CONNOR-MCCOURT, M. Predictive genomics: A cancer hallmark network framework for predicting tumor clinical phenotypes using genome sequencing data. *Semin Cancer Biol*, v. 30, p. 4-12, 2015.

WANG, J.; XU, X.; WANG, Q.; ZHANG, F.; SUN, Y.; TAN, H.; FENG, N.; ZHOU, L.; YE, Y.; CHENG, X.; SHAO, H.; XIA, Z. Effects of polymorphisms in XRCC1 and APE1 on vinyl chloride-induced chromosome damage. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, v. 32, p. 321-326, 2014.

WANG, S., SHI, X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 222, p. 3-9, 2001.

WEINBERG, R.A. *A Biologia do Câncer*. Artmed, Porto Alegre, 864p., 2008.

WHO, Department of Protection of the Human Environment. Depleted uranium sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01, Geneva: WHO, 2001.

WHO. Guide to short-terms for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals IPCS. Environ. Health Criteria. Prepared by ICPEMC. Finland, 51, 1985.

WU, P.A.; LOH, C.H.; HSIEH, L.L.; LIU, T.Y.; CHEN, C.J.; LIOU, S.H. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat Res.*, v. 562, p. 27-38, 2004.

ZHANG, Q.; ZHOU, X. D.; DENNY, T.; OTTENWELLER, J. E.; LANGE, G.; LA MANCA, J. J.; LAVIETES, M. H.; POLLET, C.; GAUSE, W. C.; NATELSON, B. H. Changes in immune parameters seen in Gulf War veterans but not in civilians with chronic fatigue syndrome. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 6, p. 6–13, 1999.

ZHAO, S.; ZHAO, F-Y. Nephrotoxic Limit and Annual Limit on Intake for Natural U. *Health Phys.*, v. 59, p. 619-623, 1990.

ZORIY, P.; OSTAPCZUK, P.; DEDERICHS, H.; HÖBIG, J.; LENNARTZ, R.; ZORIY, M. Biomonitoring of environmental pollution by thorium and uranium in selected regions of the Republic of Kazakhstan. *J Environ Radioact.*, v. 101, p. 414-420, 2010.

Anexos

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I - APROVAÇÃO DA PESQUISA NO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos do Urânio como indicador de risco à saúde de residentes do entorno da maior reserva de urânio localizada no município de Santa Quitéria-CE.

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05708712.7.0000.5054

Pesquisador: FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 84095

Data da Relatoria: 13/09/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Tese de Doutorado que visa identificar a presença de ou ausência de genotoxicidade e risco de carcinogênese, por contaminação com urânio na população que habita o entorno da maior reserva de urânio brasileira no município de Santa Quitéria - CE, para esclarecer a presença ou ausência de riscos a saúde humana nos níveis de radiação existente. É um estudo experimental onde serão estudados 240 indivíduos, 100 no grupo controle e 140 moradores da região. Os biomarcadores realizados são análise de aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleos, por método convencional, FISH eo Ensaio do Cometa.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos da exposição humana ao urânio na maior reserva natural de urânio do Brasil localizada no município de Santa Quitéria - CE. O biomonitoramento genotoxicológico desta população será realizado utilizando-se biomarcadores sensíveis à contaminação, como a frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral, aberrações cromossômicas danos ao DNA em culturas de linfócitos isolados dos habitantes dessa região.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa apresenta risco mínimo aos sujeitos que participarão do estudo, relativo à coleta do material. O pesquisador aponta como benefício a possibilidade de identificar a presença ou ausência de riscos a saúde humana nos níveis de radiação existente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância pois visa identificar a presença ou ausência de riscos a saúde humana em população exposta a radiação. Apresenta objetivos detalhados; metodologia utilizando biomarcadores sensíveis à contaminação, como a frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral, aberrações cromossômicas danos ao DNA em culturas de linfócitos isolados dos habitantes; critérios de inclusão e exclusão; análise estatística; resultados esperados; cronograma; referências bibliográficas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados folha de rosto devidamente assinada; declaração de autorização do secretário de saúde do município de Santa Quitéria; TCLE adequado; orçamento com declaração dos responsáveis

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (853)366-8338 Fax: (853)223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



pela pesquisa e Curriculum vitae do pesquisador.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado

FORTALEZA, 28 de Agosto de 2012

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (853)366-8338

Fax: (853)223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

8.2. ANEXO II - DECLARAÇÃO DA SECRETARIA MUNICIPAL DE ITATIRA**PREFEITURA MUNICIPAL DE ITATIRA
SECRETÁRIA MUNICIPAL DE SAÚDE****DECLARAÇÃO**

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos do Urânio como indicador de risco à saúde de residentes do entorno da maior reserva de urânio localizada no município de Santa Quitéria-CE.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Felipe Augusto Rocha Rodrigues.

INSTITUIÇÃO PROPONENTE: Universidade Federal do Ceará - UFC.

A Secretaria Municipal de Saúde de Itatira está ciente e autoriza a realização do projeto de pesquisa supracitado. Declara, outrossim, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, notadamente a Resolução CNS 196/96 e complementares. A Secretaria Municipal de Saúde de Itatira está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, assim como de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Itatira, 28 de Junho de 2012.

Dra. Vera Lúcia Pereira de Sousa
Secretária Municipal de Saúde

8.3. ANEXO III - DECLARAÇÃO DA SECRETARIA MUNICIPAL DE SANTA QUITÉRIA



DECLARAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos do Urânio como indicador de risco à saúde de residentes do entorno da maior reserva de urânio localizada no município de Santa Quitéria-CE.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Felipe Augusto Rocha Rodrigues.

INSTITUIÇÃO PROPONENTE: Universidade Federal do Ceará - UFC.

A Secretaria Municipal de Saúde de Santa Quitéria está ciente e autoriza a realização do projeto de pesquisa supracitado. Declara, outrossim, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, notadamente a Resolução CNS 196/96 e complementares. A Secretaria Municipal de Saúde de Santa Quitéria está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, assim como de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Santa Quitéria, 28 de Junho de 2012.

Dra. Quitéria Régia Tavares André
Secretária Municipal de Saúde

8.4. ANEXO IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Eu, **Felipe Augusto Rocha Rodrigues**, estou convidando você a participar como voluntário de uma pesquisa intitulada: **Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos do Urânio como indicador de risco à saúde de residentes do entorno da maior reserva de urânio localizada no município de Santa Quitéria-CE**, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos do urânio na saúde humana. Para participar você terá que autorizar a retirada inicialmente de 15mL de sangue. A coleta será realizada por um profissional da saúde devidamente qualificado e não lhe trará nenhum risco, podendo apenas causar um leve desconforto local devido à picada da agulha. Após a coleta o local será pressionado com algodão embebido com álcool e posteriormente será colocado um curativo adesivo (Band-Aid[®]). Após a coleta de sangue, será retirado material da boca que será obtido mediante raspagem da bochecha com espátula limpa e estéril. A coleta será realizada por um profissional da saúde devidamente qualificado e não lhe trará nenhum risco. Em nenhum momento haverá situações constrangedoras ou que causem impacto na sua saúde, como tristeza e medo. Entretanto, os resultados poderão influenciar nas ações de cuidado em saúde, especialmente no seguimento em saúde do serviço. Eu, Felipe Augusto Rocha Rodrigues, comprometo-me a utilizar o material coletado e os dados adquiridos somente para esta pesquisa. Assim, gostaríamos de contar com a sua colaboração e participação, podendo desistir em qualquer momento sem que isso acarrete qualquer penalidade, sendo assegurado sigilo nos dados de seu material colhido e seu anonimato será preservado.

Também gostaria de informar que **NÃO HÁ CONTRIBUIÇÃO FINANCEIRA** pela sua participação.

CONSETIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Tendo compreendido de forma clara tudo o que me foi informado sobre minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu **DOU MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO**. Declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada desse termo. Também estou ciente de que não receberei nenhum pagamento pela minha participação.

Em caso de dúvida me procurar, como o responsável por essa pesquisa, na Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 / Laboratório de Oncologia Experimental – Rodolfo Teófilo – CEP: 60430-160. Fones: (085) – 3366 8255 / 8201.

ATENÇÃO: se você tiver alguma consideração ou dúvida da participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC – Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo – CEP: 60430-160. Fone: (085) – 3366 8344.

Tendo sido informado acerca da pesquisa e de seus objetivos, concordo em participar da mesma:

Itatira, ____ / ____ / ____.

	_____ Felipe Augusto Rocha Rodrigues (Pesquisador)
_____ (Assinatura ou digital do(a) participante / Sujeito)	_____ Nome do responsável pela aplicação do TCLE
	_____ Assinatura do responsável pela aplicação do TCLE
_____ Nome / Assinatura da Testemunha	

DADOS DO VOLUNTÁRIO (sujeito da pesquisa):

Nome: _____

Endereço/Telefone: _____

8.5. ANEXO V – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY

Toxicogenetic biomonitoring of human population inhabiting the vicinity of the largest Uranium reserves in Brazil, in the city of Santa Quitéria-Ceará.

Felipe Augusto Rocha Rodrigues^{a,b,*}, Bruno Coêlho Cavalcanti^a, Evelyne Rolim Braun Simões^{a,b}, Claudia Pessoa^a.

^aLaboratory of Experimental Oncology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

^bBiotechCell®, Fortaleza, CE, Brazil (www.biotechcell.com.br).

* Corresponding author. Phone: +55 85 3366-8255. E-mail address: feliperbio@yahoo.com.br.

1. Introduction

Nuclear disasters such as in Goiania (Brazil), Chernobyl (former Soviet Union) and Fukushima (Japan) have always attracted a lot of attention (Lourenço et al., 2013; Milacic and Simic, 2009). However, accidents are not always the only source of danger. Chronic exposures to uranium, such as those from mining waste, are known to cause adverse human health effects, mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects (Lourenço et al., 2013; Lourenço et al., 2013; Milacic and Simic, 2009; Canu et al., 2007).

The uranium is a naturally occurring heavy metal and it is an actinide series member consisting of a three isotopes mixture: ²³⁴U, ²³⁵U and ²³⁸U which emits alpha radiation and contribute with 0.005%, 0.720% and 99.274%, respectively, to the total mass of natural uranium (Bourrachot et al., 2014; Lerebours et al., 2013; Sombra et al., 2011; Milacic and Simic, 2009; Cabrera-Palmer and Rothwell, 2008; Bleise et al., 2003). Ionizing radiation, which is emitted by this element, is considered a well-established risk factor for the development of cancer, such as hematological cancers and solid tumors (Strand et al., 2014; Zablotska et al., 2014; Sombra et al., 2011).

**8.6. ANEXO VI – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA - ARTIGOS COMPLETOS
PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

- 1- GAZIM, ZILDA ; RODRIGUES, FELIPE ; AMORIN, ANA ; REZENDE, CLÁUDIA ; SOKOVI', MARINA ; TE EVI', VELE ; VUč ; KRSTI', GORDANA ; CORTEZ, LUCIA ; COLAUTO, NELSON ; LINDE, GIANI ; CORTEZ, DIÓGENES . New Natural Diterpene-Type Abietane from *Tetradenia riparia* Essential Oil with Cytotoxic and Antioxidant Activities. *Molecules* (Basel. Online), v. 19, p. 514-524, 2014.
- 2- A. NETO, J. B. ; SILVA, C. R. ; S. NETA, M. A. ; CAMPOS, R. S. ; SIEBRA, J. T. ; SILVA, R. A. C. ; M.GASPAR, D. ; Magalhães, Hemerson I.F. ; MORAES, M. O. ; LOBO, M. D. P. ; GRANGEIRO, T. B. ; CARVALHO, T. S. ; DIOGO, E. B. T. ; SILVA JUNIOR, E. N. ; Rodrigues, Felipe Augusto Rocha ; Cavalcanti, Bruno C. ; NOBRE JUNIOR, H. V. . Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different *Candida* Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on *Candida tropicalis*. *Plos One*, v. 9, p. e93698, 2014.
- 3- RODRIGUES, F. A. R. ; BOMFIM, IGOR DA S. ; Cavalcanti, Bruno C. ; PESSOA, C. ; PESSOA, CLAUDIA DO Ó. ; WARDELL, JAMES L. ; WARDELL, SOLANGE M.S.V. ; PINHEIRO, ALESSANDRA C. ; Kaiser, Carlos Roland ; NOGUEIRA, THAIS C.M. ; LOW, JOHN N. ; GOMES, LIGIA R. ; DE SOUZA, MARCUS V.N. . Design, synthesis and biological evaluation of (E)-2-(2-arylhydrazinyl)quinoxalines, a promising and potent new class of anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Print), v. 24, p. 934-939, 2014.
- 4- RODRIGUES, F. A. R. ; BOMFIM, IGOR DA S. ; Cavalcanti, Bruno C. ; PESSOA, C. ; Pessoa, Claudia ; GONCALVES, RAONI S. B. ; WARDELL, JAMES L. ; WARDELL, SOLANGE M. S. V. ; DE SOUZA, MARCUS V. N. .

- Mefloquine-Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *Chemical Biology & Drug Design (Print)*, v. 83, p. 126-131, 2014.
- 5- Rodrigues, Felipe A. R. . Biological Evaluation of Isoniazid Derivatives as an Anticancer Class. *Scientia Pharmaceutica*, v. 82, p. 21-28, 2014.
- 6- RODRIGUES, F. A. R. ; BOMFIM, I. S. ; Cavalcanti, Bruno C. ; LIMA, C. H. S. ; SOUZA, Marcus Vinicius Nora de . BIOLOGICAL EVALUATION OF PYRAZINAMIDE DERIVATIVES AS AN ANTICANCER CLASS. *European Chemical Bulletin*, v. 3, p. 358-361, 2014.
- 7- RODRIGUES, F. A. R. ; OLIVEIRA, A. C. A. ; Cavalcanti, B. C. ; Costa, M. P. ; Pessoa, Cláudia ; PINHEIRO, A. C. ; SOUZA, Marcus Vinicius Nora de . CYTOTOXIC EVALUATION OF SUBSTITUTED BENZALDEHYDES. *EUROPEAN CHEMICAL BULLETIN*, v. 3, p. 555-558, 2014.
- 8- Cavalcanti, Bruno C. ; CABRAL, I. O. ; Rodrigues, Felipe Augusto Rocha ; Barros, Francisco Washington Araújo ; DAMASCENO, D. R. ; Magalhães, Hemerson I.F. ; Moura, DJ ; Saffi, J ; Henriques, JAP ; CARVALHO, T. S. C. ; Odorico de Moraes, Manoel ; PESSOA, C. ; MELO, I. M. M. ; J. JUNIOR, E. N. . Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 24, p. 145-163, 2013.
- 9- Arthaud, Isabelle D. B. ; Rodrigues, Felipe A. R. ; Jimenez, Paula C. ; Montenegro, Raquel C. ; Angelim, Alysson L. ; Maciel, Vânia M. M. ; Silveira, Edilberto R. ; Freitas, Hozana P. S. ; Sousa, Thiciana S. ; Pessoa, Otília D. L. ; Lotufo, Tito M. C. ; Costa-Lotufo, Leticia V. . Studies on the Secondary Metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. Isolated from Sediments Collected at the Northeastern Coast of Brazil. *Chemistry & Biodiversity (Print)*, v. 9, p. 418-427, 2012.

- 10-Carvalho Montenegro, Raquel ; Veras Costa Lotufo, Leticia ; Odorico de Moraes, Manoel ; do O Pessoa, Claudia ; Augusto Rocha Rodrigues, Felipe ; Campbell Pinheiro, Alessandra ; Cristina Mendonça Nogueira, Thais ; Vinicius Nora de Souza, Marcus . Synthesis and Antitumoral Evaluation of Benzyl (1S)-2-[2-(monosubstituted-benzylidene)hydrazino]-1-(hydroxymethyl)-2-oxoethylcarbamate. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 9, p. 257-262, 2012.
- 11-CAVALCANTI, B C ; Costa, P.M. ; Carvalho A.A. ; RODRIGUES, F. A. R. ; Amorim, R.C.S. ; SILVA, E.C.C. ; POHLIT, A.M. ; COSTA-LOTUFO, L. V. ; COSTA-LOTUFO, L. V. ; Moraes, Manoel Odorico ; PESSOA, C . Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide-induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: The role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, p. 980-993, 2012.
- 12-CARVALHO, E. B. ; MAGA, E. A. ; QUETZ, J. S. ; LIMA, I. F. ; MAGALHAES, H. Y. ; Rodrigues, Felipe Augusto Rocha ; SILVA, A. V. ; PRATA, M. M. ; CAVALCANTE, P. A. ; HAVT, A. ; BERTOLINI, M. ; BERTOLINI, L. R. ; LIMA, A. A. . Goat milk with and without increased concentrations of lysozyme improves repair of intestinal cell damage induced by enteroaggregative *Escherichia coli*. *BMC Gastroenterology (Online)*, v. 12, p. 106, 2012.
- 13-MONTENEGRO, TASSO G. C. ; RODRIGUES, F. A. R. ; Jimenez, Paula C. ; Angelim, Alysson L. ; Melo, V. M. M. ; Melo, Vânia M. M. ; RODRIGUESFILHO, EDSON ; DEOLIVEIRA, MARIA DA CONCEIÇÃO F. ; Costa-Lotufo, Leticia V. . Cytotoxic Activity of Fungal Strains Isolated from the Ascidian. *Chemistry & Biodiversity (Print)*, v. 9, p. 2203-2209, 2012.
- 14-MONTENEGRO, Raquel Carvalho ; COSTA-LOTUFO, L. V. ; Lotufo, Leticia Veras ; Moraes, Manoel Odorico ; Pessoa, Cláudia do Ó. ; RODRIGUES, F. A. R. ; Lima Ferreira Bispo, Marcelle ; Alcantara, Camila Cataldi ; Kaiser, Carlos

- Roland ; Souza, Marcus Vinícius Nora . 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-2-[(1H-pyrrol-2-yl)methylene]hydrazine: a potent compound against cancer. *Medicinal Chemistry Research (Print)*, v. 21, p. 3615-3619, 2012.
- 15-Carvalho Montenegro, Raquel ; Veras Lotufo, Leticia ; Odorico de Moraes, Manoel ; do O Pessoa, Claudia ; RODRIGUES, F. A. R. ; de Lima Ferreira Bispo, Marcelle ; Abreu Freire, Bruna ; KAISER, C. R. ; Kaiser, Carlos R. ; Vinicius Nora de Souza, Marcus . Cytotoxic Activity of Polysubstituted 7-chloro-4-quinolinyldiazine Derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 9, p. 251-256, 2012.
- 16-Cavalcanti, Bruno C. ; Ferreira, José R.O. ; Cabral, Igor O. ; Magalhães, Hemerson I.F. ; de Oliveira, Cecília C. ; Rodrigues, Felipe A.R. ; Rocha, Danilo D. ; Barros, Francisco W.A. ; da Silva, Cecília R. ; Júnior, Hélio V.N. ; Canuto, Kirley M. ; Silveira, Edilberto R. ; Pessoa, Cláudia ; Moraes, Manoel O. . Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 4051-4061, 2012.
- 17-Silva Nunes, Roberta ; Kahl, Vivian Francília Silva ; Silva Sarmiento, Merielen ; Richter, Marc François ; Costa-Lotufo, Letícia Veras ; RODRIGUES, F. A. R. ; Abin-Carriquiry, Juan Andres ; Martinez, Marcela María ; Ferronato, Scharline ; Barros Falcão Ferraz, Alexandre ; Silva, Juliana . Antigenotoxicity and Antioxidant Activity of Acerola Fruit (*Malpighia glabra* L.) at Two Stages of Ripeness. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht)*, v. 66, p. 129-135, 2011.
- 18-Cabral de Oliveira, Alane ; Hillard, Elizabeth A. ; Pigeon, Pascal ; Rocha, Danilo Damasceno ; Rodrigues, Felipe A.R. ; Montenegro, Raquel C. ; Costa-Lotufo, Letícia V. ; Goulart, Marília O.F. ; Jaouen, Gérard . Biological evaluation of twenty-eight ferrocenyl tetrasubstituted olefins: Cancer cell growth inhibition, ROS production and hemolytic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 3778-3787, 2011.

- 19-Roberta J. B. Jorge ; Alice M. C. Martins ; Isabel C. O. Morais ; Rafael M. Ximenes ; Rodrigues, Felipe Augusto Rocha ; Bruno M. Soares ; Janaína, S. A. M. Evangelista ; Marcos H. Toyama ; Aline M. A. Martins ; Manoel O. Moraes Filho ; Helena S. A. Monteiro . In vitro studies on Bothrops venoms cytotoxic effect on tumor cells. *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*, v. 9, p. 249-253, 2011.
- 20-Carvalho Montenegro, Raquel ; Costa-Lotufo, Leticia Veras ; Odorico de Moraes, Manoel ; Pessoa, Cláudia ; Rodrigues, Felipe Augusto Rocha ; Lima Ferreira Bispo, Marcelle ; Cardoso, L. N. F. ; Kaiser, Carlos Roland ; Souza, Marcus Vinícius Nora . Synthesis and Antitumoral Evaluation of 7-chloro-4-quinolinyldhydrazones Derivatives. *Medicinal Chemistry (Hilversum)*, v. 7, p. 599-604, 2011.
- 21-MONTENEGRO, R. C. ; COSTA-LOTUFO, L. V. ; MORAES, M. O. ; PESSOA, C. ; RODRIGUES, F. A. R. ; Bispo, M. L. F. ; CARDOSO, L. N. F. ; KAISER, C. R. ; KAISER, C. R. ; SOUZA, Marcus Vinicius Nora de . Synthesis and Antitumoral Evaluation of 7-chloro-4-quinolinyldhydrazones Derivatives. *Medicinal Chemistry (Hilversum)*, v. 7, p. 599-604, 2011.
- 22-Cunha-Filho, Geraldino A. ; Resck, Inês S. ; Cavalcanti, Bruno C. ; Pessoa, Cláudia Ó. ; Moraes, Manoel O. ; Ferreira, José R.O. ; RODRIGUES, F. A. R. ; dos Santos, Maria L. . Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. *Toxicon (Oxford)*, v. 56, p. 339-348, 2010.
- 23-Gomes, Regina Ferreira ; Santos, Hécio Silva dos ; Albuquerque, Maria Rose Jane R. ; Pessoa, Otília Deusdênia L. ; Lotufo, Leticia V. Costa ; Pessoa, Claudia do Ó ; Moraes, Manoel Odorico de ; RODRIGUES, F. A. R. . *Blainvillea rhomboidea*: constituintes químicos e atividade citotóxica. *Química Nova (Impresso)*, v. 33, p. 1122-1125, 2010.

- 24- Aguiar, Carlos Clayton Torres ; Alves, Claudênio Diógenes ; Rodrigues, Felipe Augusto Rocha ; Barros, Francisco Washington Araújo ; Sousa, Francisca Cléa Florenço de ; Vasconcelos, Silvânia Maria Mendes ; Macedo, Danielle Silveira . Esquizofrenia: uma doença inflamatória?. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria (UFRJ. Impresso)*, v. 59, p. 52-57, 2010.