

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

CARLA MARIA LIMA SOMBRA

**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**

**FORTALEZA
2009**

CARLA MARIA LIMA SOMBRA

**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 submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia do Ó Pessoa

**FORTALEZA
2009**

S676b Sombra, Carla Maria Lima

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/Carla Maria Lima Sombra. – Fortaleza, 2009.

94 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2009.

Orientadora : Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.
Inclui bibliografia.

1- Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo 2- Urânio. 3- Dano ao DNA. I. Pessoa, Cláudia do Ó (orientadora) II. Título.

CDD: 615.925

CARLA MARIA LIMA SOMBRA

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 submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dr.^a Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos
Universidade Federal do Pará - UFPA

Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida
Instituto de Radioproteção e Dosimetria - IRD

Prof.^a Dr.^a Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força em mais uma etapa alcançada.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Claudia Pessoa, por todo o conhecimento científico e de vida, apoio incondicional, sabedoria encorajadora e exemplo profissional.

Aos Prof.^o Dr. Odorico de Moraes, Prof.^a Dr.^a Letícia Veras Costa Lotufo e Prof.^a Dr.^a Raquel Montenegro, pelo apoio e dedicação ao crescimento do Laboratório de Oncologia Experimental.

Aos Prof.^o Dr. Rommel Burbano e Prof.^a Dr.^a Ândrea Kely Ribeiro dos Santos, pela imprescindível contribuição neste trabalho e pelos ricos ensinamentos durante minha estadia na Universidade Federal do Pará.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental: Elthon Gois, José Roberto Ferreira, Paulo Michel Pinheiro, Patrícia Marçal, Danilo Rocha, Washington Araújo, Cecília Carvalho, Arinice de Menezes, Bruno Côelho, Hemerson Iury, Gardênia Gadelha, Diego Veras, Paula Jimenez, Delano Barreto, Ana Jérсия Araújo, Kézia Oliveira, Adriana Andrade, Kristiana Mousinho, Felipe Rocha e Vanesca Frota, pelo companheirismo, apoio, força e amizade já por tantos anos pelo nosso caminho da pesquisa.

A todos do Laboratório de Genética Humana e Médica e do Laboratório de Citogenética Humana da UFPA, em especial Dayse Alencar, Igor Brasil, Amauri Freires, Milene Raiol, Daniela Leite, Anderson Marinho, Aline Seabra, Danielle Calcagno, Thaís Brilhante, Adriana Guimarães, André Khayat, Plínio Cerqueira, Prof.^a Dr.^a Patrícia de Lima e Prof.^o Dr. Marcelo Bahia, por ter sido “adotada” pelo grupo e sempre tão bem recebida na UFPA, por todos os momentos compartilhados de bancada e de diversão em Belém.

À Silvana França e a todos que fazem parte do Laboratório de Oncologia Experimental e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

Aos meus pais Sergio e Liege, irmãos Paula, Marisa e Fabio, ao meu namorado Ghislain e a todos os meus amigos, por todo o amor, apoio e confiança diários, dedico este trabalho a vocês.

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento deste trabalho.

RESUMO

A radiação ionizante é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias pelos danos causados à molécula de DNA, sendo de extrema importância, portanto, o monitoramento de populações humanas expostas a ela. O município de Monte Alegre no estado do Pará apresenta uma das maiores áreas de mineração do urânio do mundo, que se estende aos municípios vizinhos de Prainha e Alenquer. Este trabalho teve como objetivos a avaliação do potencial genotóxico do urânio presente em rochas nas residências de indivíduos dos municípios de Monte Alegre, Prainha e Alenquer através do ensaio do cometa alcalino em linfócitos periféricos e a determinação das frequências de polimorfismos nos genes de reparo do DNA *XRCC1* e *XRCC3* e no gene de metabolização *GSTM1* através de seqüenciamento direto de DNA. Na análise do cometa alcalino, não houve diferença estatisticamente significativa entre os Índices de Dano (IDs) das populações de Monte Alegre ($ID = 32,01 \pm 1,57$), Prainha ($ID = 45,80 \pm 1,12$) e Alenquer ($ID = 44,30 \pm 0,62$) e o do controle negativo ($ID = 42,00 \pm 5,75$) ($p > 0,05$). Através do seqüenciamento direto de DNA, observou-se a presença de polimorfismos nos genes *XRCC1* e *XRCC3* em regiões de íntrons e de éxons. No gene *XRCC1*, as frequências alélicas variantes para o polimorfismo *Arg194Trp* nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer foram 12%, 13% e 7% e, para *Arg399Gln*, 28%, 30% e 32%, respectivamente. No gene *XRCC3*, as frequências do alelo variante do polimorfismo *Thr241Met* encontradas nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer foram, respectivamente, 28%, 13% e 33%. Em relação ao gene *GSTM1*, as frequências obtidas de ausência do gene apresentaram os valores de 36%, 31% e 40%, respectivamente às populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer. No geral, todas as frequências alélicas nos éxons dos genes *XRCC1* e *XRCC3* e de ausência do gene *GSTM1* foram estatisticamente semelhantes entre os três municípios e se mostraram em concordância com frequências obtidas em outros estudos com populações brasileiras. Conclui-se que, dentre as populações estudadas, não houve aumento da incidência de dano ao DNA pela exposição ao urânio, o que pode se explicar pela baixa radiação nessas localidades. Além disso, as frequências alélicas dos polimorfismos encontrados nos genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3*, assim como as de ausência do gene de metabolização *GSTM1* não diferiram das encontradas em populações de outras regiões do Brasil. Desse modo, nas regiões estudadas, possivelmente não existe tendência ao desenvolvimento de câncer induzido pela exposição ao urânio.

Palavras-chave: urânio, ensaio do cometa, *XRCC1*, *XRCC3*, *GSTM1*.

ABSTRACT

Radiation is considered a risk factor for the development of several types of cancers caused by damage into the DNA molecule and is of extreme importance, therefore, the monitoring of human populations exposed to it. The municipality of Monte Alegre in the state of Pará in Brazil has one of the largest uranium mining areas of the world, which extends to the neighboring municipalities of Prainha and Alenquer. This work assessed the genotoxic potential of exposure to uranium in rocks found in dwellings in individuals from the municipalities of Monte Alegre, Prainha and Alenquer through the alkaline comet assay in peripheral blood lymphocytes and the determination of the frequencies of polymorphisms in DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* and in carcinogen-metabolism gene *GSTM1* through direct DNA sequencing. The analysis of the alkaline comet assay indicated that there was no statistically significant difference between the Damage Indexes (DIs) of Monte Alegre (DI = 32.01 ± 1.57), Prainha (DI = 45.80 ± 1.12) and Alenquer (DI = 44.30 ± 0.62) and of the negative control (DI = 42.00 ± 5.75) ($p > 0.05$). Through direct DNA sequencing, there were polymorphisms in *XRCC1* and *XRCC3* genes in regions of introns and exons. In *XRCC1* gene, the variant allele frequencies for *Arg194Trp* polymorphism in Monte Alegre, Prainha and Alenquer populations were 12%, 13% and 7%, and for *Arg399Gln*, 28%, 30% and 32% respectively. In *XRCC3* gene, the frequencies of the variant allele of *Thr241Met* polymorphism found in Monte Alegre, Prainha and Alenquer populations were, respectively, 28%, 13% and 33%. For *GSTM1* gene, the frequencies obtained for the absence of this gene were 36%, 31% and 40%, respectively to Monte Alegre, Prainha and Alenquer populations. In general, the absence frequencies of *GSTM1* gene and of allelic frequencies in *XRCC1* and *XRCC3* exons were statistically similar among the three municipalities and were in agreement with frequencies obtained in other studies with Brazilian populations. As a conclusion, among the populations studied, there was no increased incidence of DNA damage by exposure to uranium, which can be explained by the low radiation in these locations and that the allelic frequencies of polymorphisms found in the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3*, and the absence frequencies of *GSTM1* gene did not differ from those in populations from other regions of Brazil. Thus, in the studied area, possibly there is no tendency to the development of cancer induced by exposure to uranium.

Keywords: uranium, alkaline comet assay, *XRCC1*, *XRCC3*, *GSTM1*.

LISTA DE FIGURAS

1. Minério de Urânio	15
2. Decaimento do ^{238}U	17
3. Diagrama de pontos passíveis de análise pelo uso de biomarcadores	22
4. Reparo de quebras de fita simples do DNA em quebras de origem direta (via longa) e em quebras de origem indireta durante o reparo de excisão de bases (BER) (via curta)	27
5. Reparo de quebras de fita dupla do DNA através da recombinação homóloga	28
6. Localização cromossômica do gene <i>XRCC1</i>	30
7. Domínios da proteína XRCC1 e suas interações com outras proteínas	31
8. Localização cromossômica do gene <i>XRCC3</i>	34
9. Conjugação da glutathiona a um xenobiótico (X) via GST resulta na formação de um conjugado S-glutathiona	37
10. Localização cromossômica do gene <i>GSTM1</i>	39
11. Localização dos municípios de Monte Alegre, Alenquer e Prainha	41
12. Limites geográficos de ocorrência de urânio na região de Inglês de Souza (PA)	43
13. Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência	50
14. Distribuição etária em número de indivíduos das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.	56
15. Distribuição por gênero em número de indivíduos das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.	57
16. Distribuição em porcentagem das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer por categorias de hábito de fumo.	57
17. Freqüências de câncer e de histórico de câncer familiar dos voluntários das três populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.	58
18. Análise dos índices de dano ao DNA nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer pelo ensaio do cometa alcalino	60

LISTA DE TABELAS

1. Amostragem realizada para as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer	46
2. Condições da técnica de PCR.....	53
3. Seqüências dos <i>primers</i> utilizados.....	53
4. Condições de ciclagem na técnica de seqüenciamento das regiões estudadas dos genes <i>GSTM1</i> , <i>XRCC1</i> e <i>XRCC3</i>	54
5. Distribuição dos indivíduos seqüenciados para os genes de reparo <i>XRCC1</i> e <i>XRCC3</i> e para o gene <i>GSTM1</i> nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.....	61
6. Freqüências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo <i>XRCC1</i> na população de Monte Alegre.	62
7. Freqüências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo <i>XRCC1</i> na população de Prainha	63
8. Freqüências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo <i>XRCC1</i> na população de Alenquer.	63
9. Freqüências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo <i>XRCC3</i> na população de Monte Alegre.....	65
10. Freqüências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo <i>XRCC3</i> na população de Prainha	66
11. Freqüências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo <i>XRCC3</i> na população de Alenquer	67
12. Freqüências do gene de metabolização <i>GSTM1</i> nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	adenosina difosfato
AP	apurínico/apirimidínico
APE	AP-endonuclease
Arg	arginina
BER	<i>base excision repair</i>
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPRM	Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
CYPs	citocromo P450
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Gln	glicina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Met	metionina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
Thr	treonina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trp	triptofano
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
cm	Centímetro
μm	Micrômetro
t	Tonelada
α	Alfa
β	Beta
Gy	Gray
kb	Quilobase
Km ²	Quilômetro quadrado
Km	Quilômetro
ppm	Partes por milhão
mL	Mililitro
h	Hora
rpm	Rotações por minuto
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
~	Aproximadamente
V	Volt
mA	Miliamper
μg	Micrograma
nm	Nanômetro
μM	Micromolar
ng	Nanograma
mSv	Milisievert
Bq.m ⁻³	Bequerel por metro cúbico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Considerações gerais.....	13
1.2	O Urânio.....	14
1.3	Biomarcadores de exposição e susceptibilidade	21
1.4	Genes de Reparo do DNA.....	23
1.4.1	Gene <i>XRCC1</i>	30
1.4.2	Gene <i>XRCC3</i>	33
1.5	Gene <i>GSTM1</i>	36
1.6	Populações estudadas.....	40
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo Geral.....	44
2.2	Objetivos Específicos.....	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1	Aspectos Éticos.....	45
3.2	Caracterização das Amostras Populacionais	45
3.3	Seleção de voluntários	46
3.4	Obtenção das amostras	47
3.4.1	Coleta de sangue periférico.....	47
3.4.2	Isolamento dos linfócitos	47
3.5	Viabilidade celular por Exclusão de Azul de Tripan.....	48
3.6	Ensaio do Cometa Alcalino	48
3.6.1	Análise dos dados	49
3.6.2	Análises Estatísticas.....	50
3.7	Extração de DNA.....	51
3.8	Reação em Cadeia pela Polimerase	52
3.9	Reação de Sequenciamento Direto	54
3.9.1	Análises Estatísticas.....	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Caracterização das Populações	56
4.2	Biomarcador de Exposição	59
4.2.1	Viabilidade celular por Exclusão de Azul de Tripan.....	59
4.2.2	Ensaio do Cometa Alcalino	59
4.3	Biomarcadores de Susceptibilidade.....	60
4.3.1	Caracterização da amostra	60
4.3.2	Gene de reparo <i>XRCC1</i>	61

4.3.3	Gene de reparo <i>XRCC3</i>	64
4.3.4	Gene <i>GSTM1</i>	67
4.3.5	Variação Genética.....	68
4.3.6	Desequilíbrio de ligação	68
4.3.3	Associação entre genótipos dos genes <i>XRCC1</i> , <i>XRCC3</i> e <i>GSTM1</i> e os índices de dano	69
5	DISCUSSÃO	70
6	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Populações humanas podem apresentar danos genéticos por exposição acidental, ocupacional ou ambiental a agentes genotóxicos químicos e físicos, como, por exemplo, as radiações. Estes agentes podem interferir no adequado desenvolvimento da célula causando danos em seu material genético, conferindo grande risco para o desenvolvimento de neoplasias (NATARAJAN, 1993).

A radiação ionizante é considerada um fator de risco já estabelecido para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como o ósseo, de mama, leucemias, cerebral e em outras partes do sistema nervoso central, de pele não-melanoma e de tireóide (ALLEN *et al.*, 2005).

O efeito carcinogênico da radiação ionizante foi reconhecido logo após a descoberta dos raios-X por Röntgen em 1895 e o surgimento do primeiro câncer induzido por radiação foi relatado em uma área ulcerada da pele. A radiação, sendo considerada um carcinógeno universal, induz a formação de neoplasias na maioria dos tecidos em várias espécies em todas as idades, incluindo o feto (KIM; LEE, 2003).

Existem dois mecanismos principais através dos quais a radiação ionizante causa danos ao DNA. O mecanismo mais freqüente é através da ionização direta da água com a formação de radicais hidroxila altamente reativos. Menos comum (aproximadamente 30%) é o dano direto dos elétrons no DNA (FINCH, 2007). A absorção direta pode resultar na remoção de bases nitrogenadas, rompimento das pontes de hidrogênio e quebras de fita simples ou de fita dupla de DNA (MALUF, 2004). Todas as células são suscetíveis aos danos pela radiação ionizante e a extensão deste está relacionada com parâmetros físicos e biológicos que determinam a dose de radiação que é recebida por uma célula ou tecido particular (KIM; LEE, 2003).

Uma variedade de fatores secundários não-carcinogênicos pode modular a carcinogênese induzida pela radiação (KIM; LEE, 2003). O acúmulo de alterações no material genético da célula depende de vários fatores endógenos como sexo, idade e constituição genética, assim como exógenos, incluindo hábitos de consumo, alimentação, uso de medicamentos e exposição a químicos. Deste modo, além da identificação desses agentes que

podem interferir na instabilidade genética, deve-se considerar o nível de exposição individual e a suscetibilidade de cada indivíduo, enfatizando-se a existência de uma inter-relação entre fatores ambientais desencadeantes e fatores genéticos predisponentes (DU FOUR *et al.*, 2005; GATTÁS; SEGRE; WÜNSCH FILHO, 2002).

Uma vez que a maioria das exposições a agentes genotóxicos ocorre em ambientes ocupacionais, é importante monitorar esses indivíduos em risco, cujas conseqüências podem ser percebidas a curto, médio ou longo prazo. As técnicas de monitoramento permitem a identificação precoce de riscos, possibilitando a intervenção e, conseqüentemente, minimizando ou eliminando os efeitos sobre a saúde. A análise da combinação destes fatores visa inferir o risco individual de uma pessoa vir a desenvolver doenças como o câncer, frente a uma determinada exposição (GATTÁS; SEGRE; WÜNSCH FILHO, 2002).

1.2 O Urânio

O urânio é um elemento químico de símbolo U pertencente à família dos actinídeos e, à temperatura ambiente, encontra-se no estado sólido, sendo considerado um elemento metálico radioativo (DURAKOVIAE, 1999). É um metal branco-prateado, denso, dúctil e maleável, mal condutor de eletricidade (RIBERA *et al.*, 1996). Esse metal é um componente natural do meio ambiente, em que traços desse elemento podem ser encontrados tanto no solo, rochas, ar, água, alimentos, como no próprio corpo humano (Figura 1) (BEM; BOU-RABEE, 2004).



Figura 1- Minério de Urânio. Fonte: HORE-LACY, 2008.

Este elemento foi o primeiro onde se descobriu a propriedade da radioatividade em 1789, pelo alemão Martin Heinrich Klaproth, que o nomeou em homenagem ao recém-descoberto planeta Urânio (CRAFT *et al.*, 2004). O urânio é utilizado na indústria bélica (bombas atômicas e espoleta para bombas de hidrogênio) e na construção de usinas nucleares, com o objetivo de geração de energia elétrica (DURAKOVIAE, 1999).

O urânio reage praticamente com todos os elementos não-metálicos, exceto gases nobres; dissolve-se em ácido clorídrico e nítrico, enquanto que os ácidos não oxidantes como o sulfúrico, fosfórico e similares, dissolvem-no muito lentamente. É inerte aos álcalis, mas não aos peróxidos, com os quais forma peruranatos. Embaça ao ar; é atacado por vapores quentes de água (DURAKOVIAE, 1999; RIBERA *et al.*, 1996).

Encontram-se vestígios de urânio em quase todas as rochas sedimentares da crosta terrestre, embora este não seja muito abundante em depósitos concentrados. Os principais depósitos destes minérios situam-se nos EUA, Canadá, Rússia e França (DURAKOVIAE, 1999).

Antes do advento da energia nuclear, o urânio tinha aplicações muito reduzidas, 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. Atualmente, a aplicação mais importante do urânio é a energética (DURAKOVIAE, 1999; RIBERA *et al.*, 1996).

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. Existem 19

isótopos de urânio e todos são radioativos (CRAFT *et al.*, 2004). Estes apresentam as mesmas propriedades químicas em vista do número igual de prótons (92), mas diferentes propriedades radiológicas. O urânio de ocorrência natural contém três isótopos: ^{238}U , ^{235}U e ^{234}U , que, em massa, representam 99,3%; 0,72% e 0,006%, respectivamente, do urânio natural (BLEISE; DANESI; BURKART, 2003; RIBERA *et al.*, 1996).

A radioatividade dos isótopos é dependente do tempo de meia-vida. O isótopo de urânio de ocorrência natural mais abundante, ^{238}U , tem a meia-vida mais longa ($4,47 \times 10^9$ anos) e, conseqüentemente, a menor atividade específica, enquanto que o menos abundante, ^{234}U , por sua alta atividade específica, contribui tanto quanto ^{238}U em radioatividade. As meias-vidas físicas do ^{235}U e ^{234}U são de aproximadamente $7,04 \times 10^8$ anos e $2,46 \times 10^5$ anos, respectivamente (BLEISE; DANESI; BURKART, 2003).

Todos os isótopos naturais de urânio emitem partículas alfa, que são formadas por dois prótons e dois nêutrons. Por seu tamanho e carga positiva, essas partículas têm pouco poder de penetração (aproximadamente 4 cm no ar e 50 μm em tecido mole), portanto, são incapazes de penetrar a camada superficial de queratina da pele humana. Desse modo, o urânio representa principalmente perigo de radiação interna (BEM; BOU-RABEE, 2004).

Os isótopos de urânio decaem em outros elementos radioativos que eventualmente formam isótopos estáveis de chumbo. Durante esse processo, radiações beta e gama também são emitidas, em que o isótopo ^{235}U emite partículas alfa e gama durante o decaimento e o isótopo U^{238} emite partículas alfa e beta (BEM; BOU-RABEE, 2004). A figura 2 ilustra o decaimento do ^{238}U . Partículas beta têm maior poder de penetração na pele que as partículas alfa. Os raios gama são extremamente penetrantes e podem representar perigo tanto externo como interno (BLEISE; DANESI; BURKART, 2003).

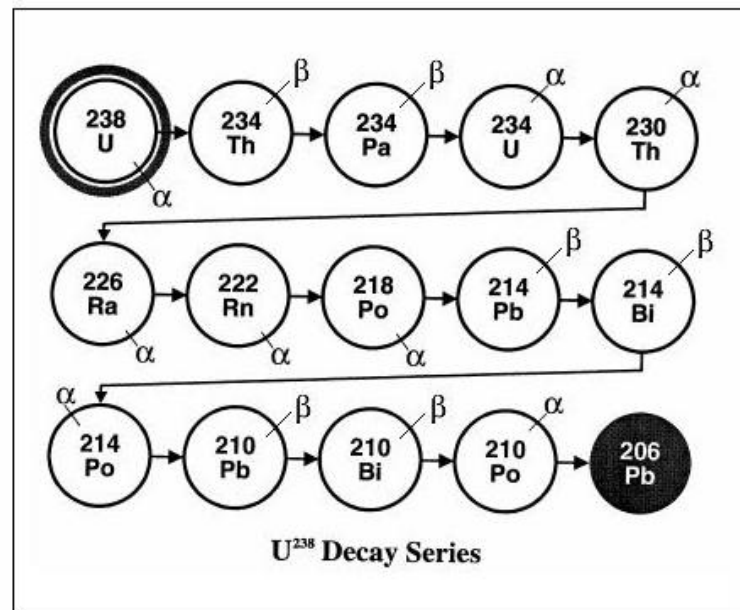


Figura 2 - Decaimento do ^{238}U através da emissão de partículas alfa até a formação de chumbo (Pb).
Fonte: TAYLOR; McINTOSH; WALKER, 2001.

A radiação ionizante do urânio pode interferir nas funções celulares em todos os níveis de organização da célula (CHAUDHRY, 2008), induzindo toxicidades química e radiológica e envenenamento de baixa intensidade (inalação ou absorção pela pele). Entre os diversos efeitos colaterais, estão: náusea, dor de cabeça, vômito, diarreia e queimaduras (DURAKOVIAE, 1999; MILLER *et al.*, 1998; RIBERA *et al.*, 1996; THIÉBAULT *et al.*, 2007), além de possíveis efeitos mutacionais no DNA resultantes de baixas doses de radiação (CHAUDHRY, 2008).

A exposição à radiação ionizante pode apresentar efeitos na saúde de curto e longo prazos e seu efeito no organismo é cumulativo (BURNHAM; FRANCO, 2005), podendo então provocar o desenvolvimento de neoplasias. Para os trabalhadores das minas, são frequentes os casos de câncer no pulmão (DURAKOVIAE, 1999; RIBERA *et al.*, 1996). Operários de usinas nucleares expostos ocupacionalmente ao urânio apresentaram um risco maior de mortalidade por neoplasias do pulmão, laringe e tecidos linfáticos e hematopoiéticos (CANU; ELLIS; TIRMARCHE, 2008). O bombardeamento das cidades de Hiroshima e Nagasaki no Japão no final da segunda guerra mundial representou uma fonte de radiação gama, em que o aumento da incidência de leucemia foi relacionado principalmente com pessoas expostas durante a infância, além do aumento da incidência de tumores sólidos de mama, pulmão e cólon (FUCIC *et al.*, 2008).

Quando internalizado no organismo, o metal se deposita no trato gastrointestinal e nos pulmões, podendo chegar à corrente sanguínea e rapidamente ser depositado nos tecidos, predominantemente nos túbulos proximais dos rins e nos ossos, apesar de grande parte ser excretada pela urina ou fezes. Uma pequena parte poderá se depositar nos pulmões e fígado, apresentando efeito tóxico também no sistema cardiovascular, fígado, músculos, e sistema nervoso (CRAFT *et al.*, 2004).

A intoxicação renal é o principal efeito adverso do urânio e pode ser diagnosticada dentro de poucos dias após a exposição. Foram observadas células necróticas no epitélio tubular do rim em animais afetados e mudanças glomerulares com efeitos severos como diminuição do *clearance* da insulina e creatinina em animais expostos ao urânio (CRAFT *et al.*, 2004).

A toxicidade radioativa de isótopos do urânio é conhecida desde o início da era nuclear, com evidências bem documentadas da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento (DURAKOVIAE, 1999). Diminuição da fertilidade, toxicidade embriônica/fetal, teratogenicidade e redução do crescimento da prole foram observadas após exposição ao urânio em diferentes períodos gestacionais de camundongos (DOMINGO, 2001).

O maior uso nuclear do urânio é como combustível para reatores nucleares e em armas nucleares. Apenas o isótopo ^{235}U é fissível, portanto a concentração desse isótopo nos reatores nucleares precisa ser aumentada, o chamado enriquecimento do urânio. Um produto desse processo é o urânio empobrecido, em que 5 Kg desse produto são produzidos com a obtenção de 1 Kg de urânio enriquecido a 3% de ^{235}U (BEM; BOU-RABEE, 2004; BLEISE; DANESI; BURKART, 2003).

O urânio empobrecido consiste então em um elemento onde o isótopo ^{235}U do urânio natural é parcialmente retirado. Compostos típicos de urânio empobrecido contêm 99.8% da particular ^{238}U com meia vida radioativa de 4.5×10^9 anos, e 0.2% da partícula ^{235}U com meia vida radioativa de 700 milhões de anos. O urânio empobrecido é um metal radioativo pesado e pirofórico, com atividade específica mais baixa que o urânio natural em 60% e 1,7 vezes mais denso que o chumbo (SCHRODER *et al.*, 2003).

A alta densidade do urânio combinada com a baixa radioatividade torna o urânio empobrecido atrativo para o uso militar. Munição contendo urânio empobrecido foi usada principalmente nas Guerras do Golfo e dos Balcãs (Bósnia – 1994, Kosovo e Sérvia – 1999) (CRAFT *et al.*, 2004). Na guerra de Kosovo, foram usadas aproximadamente 10 t de urânio empobrecido (BLEISE; DANESI; BURKART, 2003).

No uso militar, a exposição externa ao urânio pode resultar de cenários militares convencionais incluindo o uso de armas nucleares e exposições de baixa dose durante ataques terroristas, em que atuam principalmente os raios beta e gama. Alternativamente, a exposição interna pode resultar da exposição ao urânio empobrecido via ferimentos de estilhaços de projéteis e inalação (MILLER *et al.*, 2005).

A exposição interna ao urânio empobrecido pode ocorrer por três vias: ingestão (alimento e água), inalação (aerossol) e por fragmentos incrustados ou por ferimentos contaminados (maioria em soldados). A inalação é considerada a principal via de exposição ao urânio empobrecido em situações ou não de combate, em que a geração de aerossóis ocorre com o impacto de superfícies duras e por fogo (BLEISE; DANESI; BURKART, 2003).

Alguns veteranos da Guerra do Golfo e dos Balcãs desenvolveram uma síndrome 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 elevados níveis de urânio empobrecido (GAO, 2000).

Foi relatada a presença de *amplicons* em células sanguíneas de veteranos da Guerra do Golfo, sugerindo que essas alterações genéticas 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; DURRINGTON; MACKNESS, 2000). Todos estes efeitos podem ter relação com a exposição a elevados 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 elevados níveis de urânio empobrecido (SCHRODER *et al.*, 2003). Um dos estudos indica alta incidência de aberrações cromossômicas e mudanças morfológicas nucleares e citoplasmáticas 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 (MILACIC *et al.*, 2004). A instabilidade genômica é evidenciada até mesmo muitas décadas após a exposição à radiação (STREFFER *et al.*, 2002).

Exposição a elevados níveis deste elemento aumenta a incidência de alguns tipos de câncer, como o câncer de pulmão e leucemia, como alguns casos registrados de leucemia

em soldados de Kosovo (BEM; BOU-RABEE, 2004; WHO, 2001). A exposição ao urânio empobrecido aumentou a incidência de câncer no Iraque após a Guerra do Golfo, em que regiões ao sul desse país apresentaram um aumento em três a cinco vezes nos casos registrados de câncer, a maioria afetando pulmão, brônquios, bexiga e pele. Além disso, houve um aumento na incidência de câncer de estômago em homens, de mama em mulheres e um aumento geral nos casos de leucemia (AITKEN, 1999).

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.

A carcinogenicidade do urânio empobrecido foi demonstrada também por Hahn *et al.* (2002), em que a implantação do metal no tecido muscular de ratos provoca reações proliferativas localizadas e sarcoma de tecidos moles.

A irradiação de fibroblastos humanos por partículas alfa em baixas doses (0,1 e 1 Gy) induziu instabilidade genômica e um aumento dose dependente de aberrações cromossômicas em células irradiadas e não-irradiadas vizinhas. A instabilidade genômica foi independente da dose, o que indica o risco para carcinogênese induzida por radiação, principalmente por baixas doses de radiação ionizante (PONNAIYA *et al.*, 2004). Evidências sugerem que baixas doses de radiação possam estar relacionadas com o desenvolvimento de leucemia linfocítica crônica (SCHUBAUER-BERIGAN *et al.*, 2007).

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 conseqüências fisiológicas da exposição ao urânio empobrecido através desta rota alternativa (PELLMAR *et al.*, 1999).

Muitos dos efeitos do urânio empobrecido é conseqüência de danos ao DNA resultantes da interação direta do urânio com o DNA, em que esta induz a formação de adutos no DNA demonstrada em células EM6 de ovário de hamster chinês (STEARNS *et al.*, 2005) e em células de colón humanas (KNOBEL *et al.*, 2006). Esses danos também podem ser indiretamente causados pela indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela exposição ao urânio, como já relatado por Thiébault *et al.* (2007) e Monleau *et al.* (2006).

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). Em vista da exposição humana ao radônio ser ubíqua, este é considerado um dos maiores contribuidores para a exposição da população mundial a radiação (BLEISE; DANESI; BURKART, 2003), em que 30% das mortes por câncer de pulmão em não-fumantes nos Estados Unidos podem ser atribuídas ao radônio residencial (ALAVANJA, 2002). O radônio possui uma meia-vida de 3,8 dias e atividade radiológica 10.000 vezes maior que o urânio (McDIARMID, 2001).

A exposição a radônio em minas de urânio foi considerada a causa para o desenvolvimento de câncer de pulmão em mineradores, em que se observou uma relação significativa entre a exposição cumulativa ao radônio e o risco a esse tipo de câncer (McDIARMID, 2001; VACQUIER *et al.*, 2009). Além disso, Rericha *et al.* (2006) indicaram uma associação entre a incidência de leucemia em mineradores de urânio em subsolo na República Tcheca com a exposição cumulativa ao radônio.

Como, em casos de suspeita de exposição à radiação ou em situações acidentais, a dosimetria física é freqüentemente incompleta ou ausente, a necessidade de indicadores biológicos de exposição há muito tempo é reconhecida (AMUNDSON *et al.*, 2001). A importância do uso de marcadores biológicos no monitoramento populacional está relacionada com a possibilidade de se prever um risco aumentado para o desenvolvimento de conseqüências à saúde em longo prazo (AU *et al.*, 1996).

1.3 Biomarcadores de exposição e susceptibilidade

Em 1982, teve início o novo campo da epidemiologia molecular com o trabalho de Perera e Weinstein, que propuseram a incorporação de técnicas laboratoriais para o estudo das bases bioquímicas e moleculares da etiologia de doenças. Hoje, os vários ensaios utilizados são conhecidos como biomarcadores.

Os biomarcadores são relevantes na avaliação de riscos à saúde em populações expostas a diversos agentes tóxicos ambientais, incluindo elementos radioativos (AU *et al.*, 1996), podendo ser de exposição, como o ensaio do cometa, de efeitos biológicos precoces e de risco à saúde, como os testes de aberrações cromossômicas e do micronúcleo (BONASSI; AU, 2002).

A importância do uso do ensaio do cometa em estudos humanos em biomonitoramento se evidencia com o aumento do número de trabalhos em que se aplica o

ensaio para a avaliação do dano ao DNA em indivíduos expostos a substâncias genotóxicas resultante do estilo de vida, poluição ambiental ou ocupação (FAUST *et al.*, 2004). Lesões no DNA medidas pelo ensaio do cometa refletem exposição recente a agentes clastogênicos (MATEUCA *et al.*, 2005).

A utilização de biomarcadores desempenha um papel fundamental na investigação de susceptibilidade genética e de mecanismos de indução de doenças, visto que podem ser usados para prever o desenvolvimento de doenças e para a implementação de programas de prevenção. Dentre eles, os biomarcadores que indicam as variações inter-individuais em resposta à exposição possuem um papel significativo na determinação dos indivíduos mais susceptíveis e precisam ser incorporadas nos estudos para uma melhor previsão de doenças de causa ambiental, sendo hoje o uso destes uma estratégia promissora (BONASSI; AU, 2002).

Em uma população exposta, indivíduos com polimorfismos genéticos no metabolismo/detoxificação de xenobióticos e em genes de reparo do DNA podem apresentar um risco aumentado na exposição a agentes tóxicos específicos. A exposição excessiva a esses compostos irá causar danos ao DNA, erros no reparo e instabilidade genética (AU *et al.*, 1996). A figura 3 indica os pontos em que é possível o estudo de susceptibilidade genética e efeitos biológicos através do uso de biomarcadores.

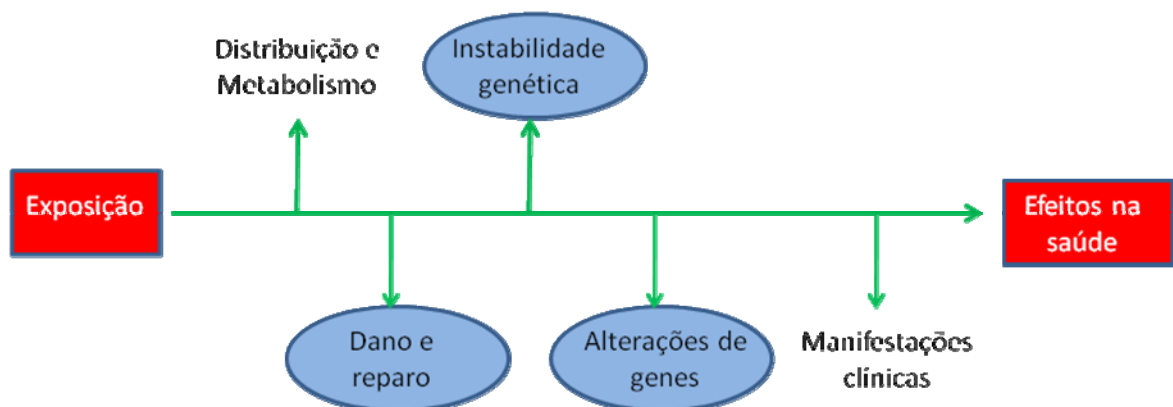


Figura 3 – Diagrama de pontos passíveis de análise pelo uso de biomarcadores (círculos azuis). Fonte: Modificada de Au *et al.*, 1996.

A resposta individual aos agentes físicos e químicos ambientais varia dependentemente da presença de variações na seqüência do DNA dentro de genes críticos. Esses polimorfismos genéticos podem afetar o nível de expressão, a estrutura ou a atividade

catalítica de enzimas metabólicas ou de reparo do DNA, influenciando, portanto, na susceptibilidade a agentes tóxicos (MILLER; MOHRENWEISER; BELL, 2001).

A análise dos polimorfismos nesses genes tem uma contribuição importante para o entendimento da distribuição dos riscos de exposição nas populações humanas, na estimativa desses riscos em subpopulações susceptíveis e, possivelmente, em prever riscos individuais em vista de exposição (MILLER; MOHRENWEISER; BELL, 2001).

Tipos comuns de variação na seqüência do genoma humano incluem polimorfismos de nucleotídeo único - SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), polimorfismo de inserção/deleção e variações no número de repetições de certos motivos (por exemplo, os microsátélites). Entre essas variações, os SNPs são os mais abundantes, estáveis e amplamente distribuídos pelo genoma (IIDA *et al.*, 2001).

A susceptibilidade ao câncer é uma característica poligênica, que envolve tanto alelos de alto risco (maior penetrância) como também alelos de baixa penetrância. Estes últimos irão igualmente determinar a penetrância da doença como modificadores genéticos adicionais, em que cada um contribui com pequenos efeitos para o total componente genético da patogênese do câncer (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003).

1.4 Genes de Reparo do DNA

Mutágenos endógenos e exógenos estão regularmente causando danos ao DNA (HAN *et al.*, 2006). Danos causados por radiação ionizante incluem mudanças estruturais nas bases nitrogenadas, com a formação de sítios em que a base foi removida (sítiosapurínicos e apirimidínicos), quebras das ligações de hidrogênio entre as duas hélices, quebra de fita simples ou dupla, promoção de ligações cruzadas e até mesmo mudanças epigenéticas no DNA, podendo levar à formação de alterações cromossômicas (FINCH, 2007; MALUF, 2004).

As quebras de fita simples são a forma mais comum de mudanças na fita de DNA induzidas por radiação, sendo consideradas lesões transientes pró-mutagênicas. A proporção de quebras de fita simples para as de fita dupla causadas por radiação de baixa energia é aproximadamente 25:1. Com radiações de energia maior, essa proporção pode chegar até 1:1. Quebras de fita dupla são mais lentamente reparadas e mais prováveis de reparo errôneo, podendo resultar em aberrações cromossômicas estáveis e instáveis. As fontes principais de

quebras de fita dupla são a radiação ionizante, certos antibióticos e endonucleases. (FINCH, 2007; VODICKA *et al.*, 2004).

Um dos tipos mais comuns de dano oxidativo no DNA resultante de espécies reativas de oxigênio é a formação de 8-oxoguanina, podendo ser causada pela exposição à radiação ionizante, além da formação de quebras de fita simples pela exposição a espécies reativas de oxigênio (HORTON *et al.*, 2008; TUDEK, 2007). Elevado nível de dano ao DNA acompanha o desenvolvimento de diversas doenças humanas e evidências indicam que o câncer humano pode ser iniciado por danos causados principalmente por UV, radiações ionizantes e agentes químicos ambientais (HAN *et al.*, 2006). Altas concentrações de 8-oxoguanina, por exemplo, foram evidenciadas em DNA de leucócitos e na urina de pacientes de câncer de pulmão e cólon (TUDEK, 2007).

O reconhecimento do dano ao DNA pela maquinaria celular indica que variadas respostas podem ocorrer para prevenir a replicação na presença desses erros genéticos: os *checkpoints* poderão ser ativados para a parada do ciclo celular, a transcrição poderá sofrer *upregulation* para compensar o dano ou a célula poderá entrar em apoptose. Alternativamente, o dano poderá ser reparado ao nível do DNA, possibilitando a replicação pela célula como planejado (GOODE; ULRICH; POTTER, 2002; VISPÉ *et al.*, 2000).

A taxa de reparo de danos no DNA resultantes da radiação é majoritariamente representada pelo mecanismo de excisão de bases (BER) e, secundariamente pelo mecanismo de excisão nucleotídica (NER), através do reparo de foto-produtos, sendo a primeira via a mais importante no reparo de danos oxidativos no DNA (TUDEK, 2007; VODICKA *et al.*, 2004).

Quebras de fita simples no DNA podem surgir indiretamente, como intermediários da via de reparo BER, ou diretamente através de danos a desoxirribose, configurando como uma ameaça à integridade genética. Essas lesões são reparadas pelo sistema de reparo de fita simples (SSBR) e pela própria via BER (CALDECOTT, 2003).

A via BER repara bases inapropriadas (erro de pareamento ou bases lesadas) que surgem por erros na replicação ou através de modificações por oxidação, alquilação ou desaminação; sítios de perda de base que são formados por enzimas, espontaneamente ou induzidas por mutágenos; e quebras de fita que são produtos do ataque de radicais livres ao DNA. Muitos desses mesmos danos são gerados por agentes anticâncer e mutágenos ambientais, que geram radicais livres, como a radiação ionizante e antibióticos radiomiméticos (WILSON, 2008). Algumas vias específicas no reparo BER estão diminuídas em pacientes com câncer, podendo representar fatores de risco. Além disso, a eficiência dessa

via pode ser alterada por espécies reativas de oxigênio e componentes da dieta (TUDEK, 2007).

A via BER acontece em várias etapas: inicia com o reconhecimento de dano específico e excisão da base lesionada ou com erro de pareamento, seguido por clivagem de ligações fosfodiéster da estrutura açúcar-fosfato, excisão do sítio abásico (apurínico/apirimidínico – AP), preenchimento do espaço por DNA e junção de extremidades. O reconhecimento e remoção de bases dependem de DNA glicosilases, o que resulta na formação de um sítio AP. Esse sítio é processado tanto por DNA glicosilases bifuncionais com atividade 3' AP liase ou por DNA glicolilases monofuncionais. Estas são assistidas por AP-endonucleases (APE), que hidrolisam ligações fosfodiéster na porção 5' do sítio AP. Esse processo resulta em quebra de fita simples com extremidades incomuns: uma desoxirribose-fosfato abásica na extremidade 5' (5'dRP) e um grupo hidroxila na extremidade 3'. Para permitir o preenchimento pela DNA polimerase e junção pela DNA ligase, essas extremidades precisam ser restauradas para as extremidades convencionais 5'-fosfato e 3'-OH. A atividade 5'dRPase da DNA polimerase β (Pol β) permite isso. O restante do processo pode ocorrer em duas sub-vias: uma curta e outra longa. Na curta, os nucleotídeos são incorporados à fita pela DNA polimerase β e as extremidades unidas pelo complexo DNA ligase III α (LigIII α) e XRCC1 em mamíferos, que ativa a ligação das extremidades pela DNA ligase (Figura 4). Na sub-via mais longa, a Pol β incorpora nucleotídeos, entretanto quando a porção 5' não pode ser mais processada, a alongação adicional e o deslocamento da fita são realizados pelas polimerases δ e ϵ . A estrutura resultante é removida pela endonuclease FEN1 e as extremidades selada pela DNA ligase I (LigI) (Figura 4) (BAUTE; DEPICKER, 2008; TUDEK, 2007). Outro participante do reparo de via longa é a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), em que esta se liga a quebras de fita simples e dupla, funcionando como um sensor. Acredita-se que essa ligação a quebras de fita simples tem efeito protetor na conversão destas em quebras de fita dupla, preservando, então, o substrato para o reparo BER (BAUTE; DEPICKER, 2008; CALDECOTT, 2003).

A XRCC1 é uma proteína nuclear de plataforma que, apesar de não ter ação enzimática, interage com enzimas-chave envolvidas no reparo de quebras de fita simples, fazendo parte do complexo de proteínas de ligação ao DNA. Coordena estágios consecutivos e interage com diversas enzimas, como APE1, PARP1, DNA polimerase β e DNA ligase III. É recrutada ao sítio de dano ao DNA pelas DNA glicosilases, AP-endonucleases ou pela PARP e permanece até o último estágio de ligação, regulando e coordenando todo o processo (HORTON *et al.*, 2008; TUDEK, 2007).

Quebras de fita dupla no DNA são importantes ameaças à integridade do genoma, já que, diferentemente de outros tipos de lesões ao DNA, previnem o uso da fita complementar como molde para reparo. Isso significa que as quebras de fita dupla são potentes indutoras de aberrações cromossômicas, que podem afetar simultaneamente muitos genes e levar a célula ao mau funcionamento e à morte celular (van GENT; HOEIJMAKERS; KANAAR, 2001).

Uma das vias principais de reparo de quebras de fita dupla do DNA é o reparo por recombinação homóloga, que envolve a reação entre três moléculas de DNA: duas extremidades de fita de DNA e um DNA molde (Figura 5). A recombinação homóloga é mediada pelo grupo de proteínas RAD52, que inclui a RAD50, RAD51 e RAD54 e MRE11. A proteína ATM medeia a resposta celular inicial a quebras de fita dupla juntamente com a NBS1. O segundo passo do reparo inclui o reconhecimento das extremidades de DNA pela RAD52 e processamento nucleolítico destas com a formação de fitas simples nessas extremidades. A proteína RAD51 se liga a essas fitas simples (formação de um filamento nucleoprotéico), mediando a busca pelo DNA homólogo de fita dupla e a formação da junção de moléculas entre as extremidades do DNA lesionado e o molde de reparo. Os seguintes estágios referem-se à polimerização dos nucleotídeos pela DNA polimerase para a restauração das fitas de DNA degradadas a partir da fita molde, dispersão dos intermediários do reparo e liberação das moléculas de DNA (van GENT; HOEIJMAKERS; KANAAR, 2001).

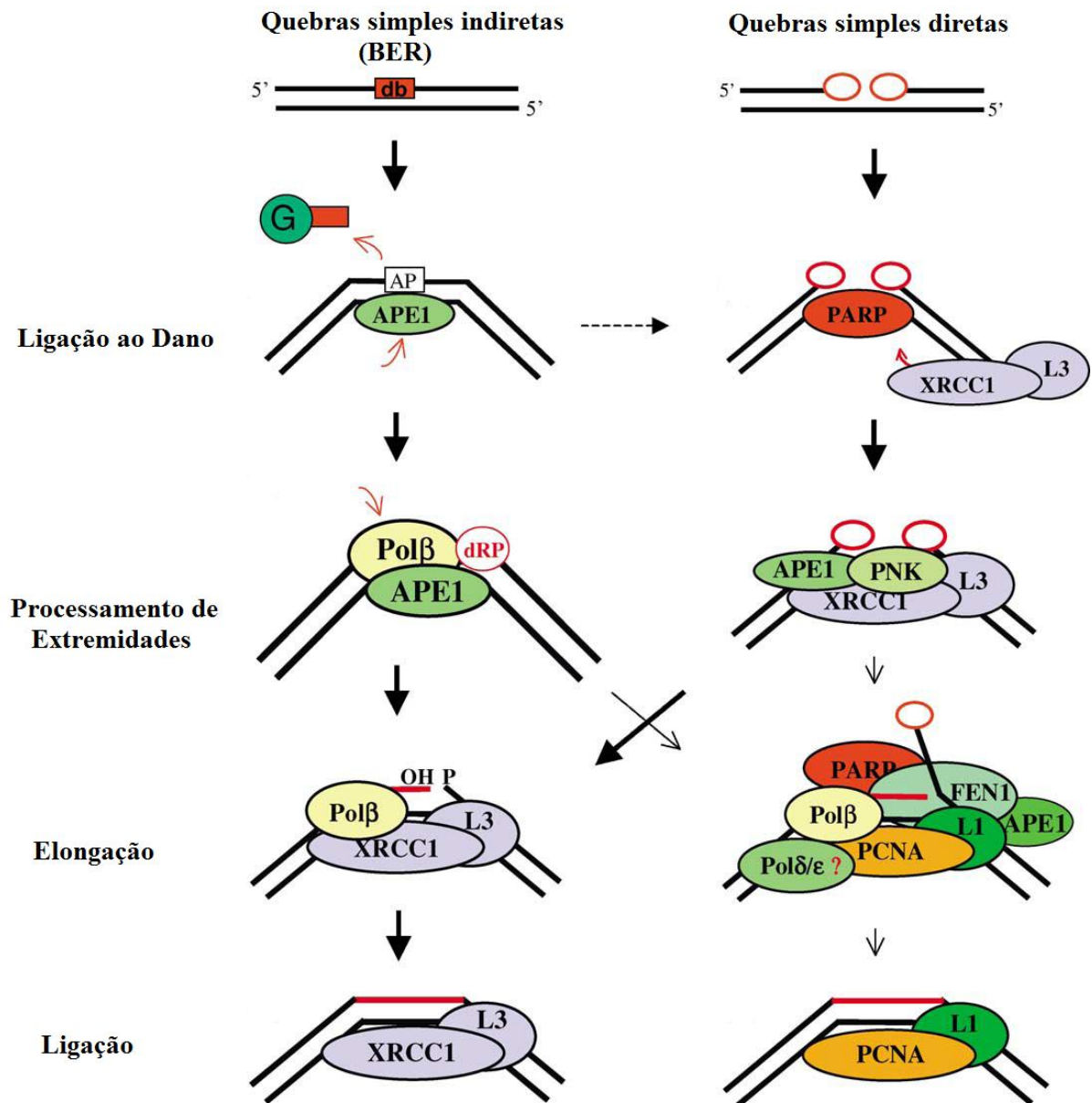


Figura 4 – Reparo de quebras de fita simples do DNA em quebras de origem direta (via longa) e em quebras de origem indireta durante o reparo de excisão de bases (BER) (via curta). G: DNA glicosilase; L3: DNA ligase III α ; L1: DNA ligase I; PCNA: antígeno nuclear de proliferação nuclear; PNK: polinucleotídeo quinase. Fonte: Modificada de Caldecott, 2003.

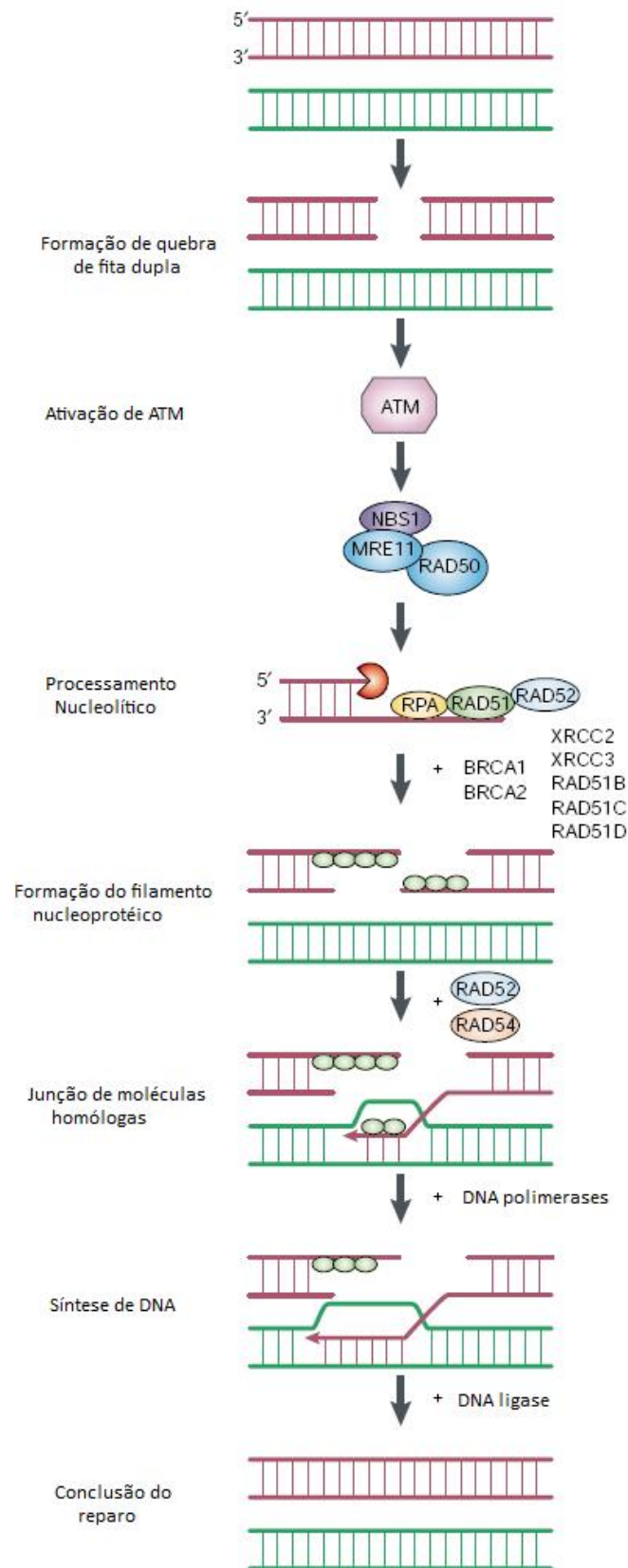


Figura 5 – Reparo de quebras de fita dupla do DNA através da recombinação homóloga. Fonte: Modificada de van Gent, Hoeijmakers e Kanaar, 2001.

Entre as proteínas que auxiliam a RAD51 em vários estágios do reparo por recombinação homóloga, está a proteína XRCC3. Esta, juntamente com outras, tem uma participação importante na manutenção da estabilidade cromossômica. Células murinas em que o gene *XRCC3* está mutado apresentam níveis reduzidos em até 25 vezes de reparo por recombinação homóloga (PIERCE *et al.*, 1999) e elevados níveis de aberrações cromossômicas e segregação cromossomal anormal na mitose (GRIFFIN *et al.*, 2000).

O reparo do DNA é um exemplo de um processo celular em que a variação genética parece estar associada a riscos de desenvolvimento de doenças, incluindo o câncer. (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003). Os genes envolvidos são cada vez mais estudados em vista de seus papéis críticos em manter a integridade do genoma e na prevenção da carcinogênese. Por essa importância, são hoje considerados genes de susceptibilidade ao câncer (HUNG *et al.*, 2005; GOODE; ULRICH; POTTER., 2002).

Vários estudos podem indicar que polimorfismos em genes de reparo do DNA representam um fator de risco ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, mas já não o seriam para outras neoplasias, como também os mesmos polimorfismos podem diminuir o risco para um terceiro grupo de cânceres. Sendo o câncer uma doença complexa, o mesmo polimorfismo pode apresentar diferentes papéis na susceptibilidade ao câncer em diferentes populações. Além disso, o conhecimento incompleto das funções biológicas dos alelos variantes torna difícil a interpretação de diferenças que podem ser específicas para cada tecido (HAN *et al.*, 2006).

Variações inter-individuais na capacidade de reparo do DNA, determinadas por polimorfismos em genes de reparo do DNA, podem ser herdadas ou resultantes de alterações na expressão gênica induzidas por fatores epigenéticos, como hábito ao fumo (MARCON *et al.*, 2003). Esses polimorfismos podem alterar a função da proteína e a capacidade individual em reparar o DNA com danos, o que torna esses genes essenciais para a estabilidade genética (GOODE; ULRICH; POTTER, 2002, SEEDHOUSE *et al.*, 2004).

Para genes de baixa penetrância, como o *XRCC1* e *XRCC3*, entretanto, sutis diferenças no nível de proteínas ou na suas atividades resultantes desses polimorfismos são certamente tolerados pelas células. Apesar disso, essas diferenças podem ter um efeito quando um nível elevado de dano ao DNA está presente (SEEDHOUSE *et al.*, 2004), podendo este ser o caso de uma exposição prolongada ao urânio.

1.4.1 Gene *XRCC1*

O gene *XRCC1* humano (do inglês *X-ray repair cross-complementing group 1*) está localizado no cromossomo 19q13.2, é composto de 17 éxons e codifica a proteína nuclear XRCC1, que é composta de 633 aminoácidos (Figura 6) (HUNG *et al.*, 2005). Essa proteína apresenta três domínios funcionais: um domínio de ligação a DNA N-terminal (ligação específica com quebras de fita simples de DNA) e os domínios BRCT-I central e BRCT- II C-terminal (HORTON *et al.*, 2008). A Figura 7 indica os domínios funcionais da XRCC1 e as regiões de interações com outras proteínas.

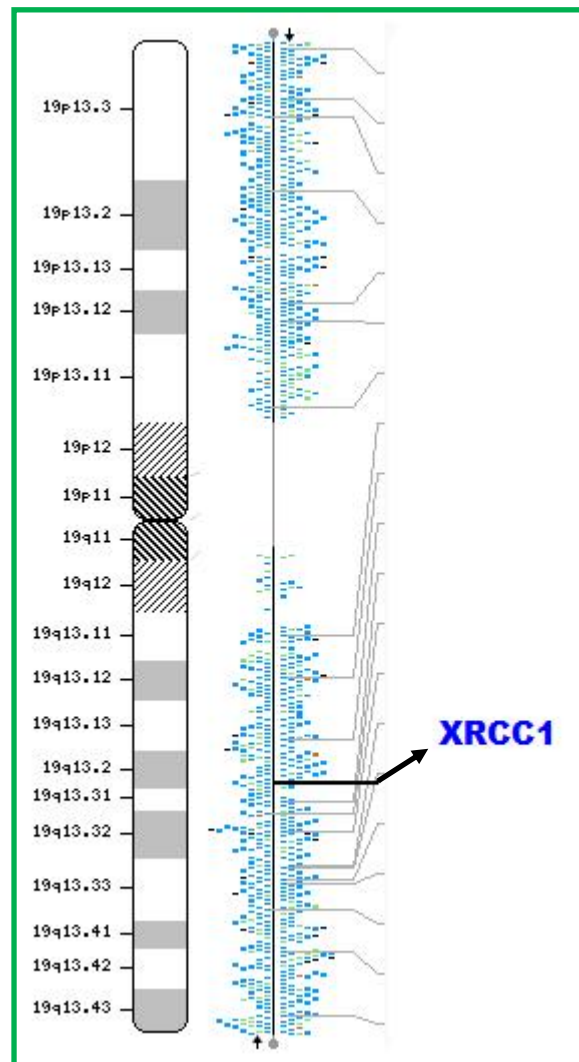


Figura 6 - Localização cromossômica do gene *XRCC1*. Fonte: NCBI Map Viewer adaptado.

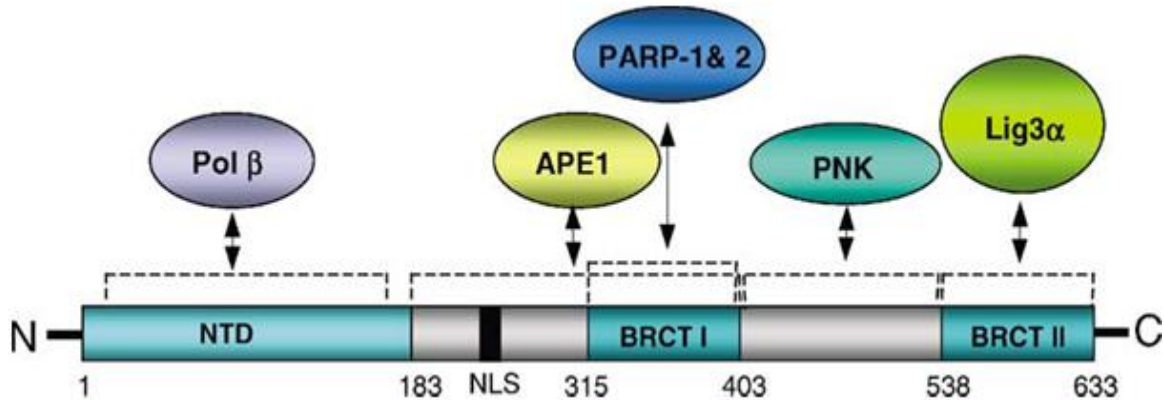


Figura 7 – Domínios da proteína XRCC1 e suas interações com outras proteínas. NTD: domínio N-terminal; NLS: sinal de localização nuclear; Pol β : DNA polimerase β ; PNK: polinucleotídeo quinase; Lig3 α : DNA ligase 3 α . Fonte: CALDECOTT, 2003.

Mais de 60 SNPs no *XRCC1* estão listados na base de dados do Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>), entre os quais aproximadamente 30 variações estão localizadas em éxons e regiões promotoras. Dois dos mais estudados SNPs são *Arg194Trp* no éxon 6 (Base de dados de SNPs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) nº rs1799782) e *Arg399Gln* no éxon 10 (nº rs25487), sendo estas substituições em duas regiões conservadas do gene *XRCC1* (HUNG *et al.*, 2005; SHEN; JONES; MOHRENWEISER, 1998). Regiões conservadas em proteínas normalmente medeiam interações proteína-proteína e regulam atividades enzimáticas (MILLIKAN *et al.*, 2005).

A troca de nucleotídeos de C para T na posição 26304 do gene *XRCC1* induz a troca de aminoácidos de arginina para triptofano no éxon 6 da proteína no códon 194 da proteína (*Arg194Trp*). Esse códon se encontra na região intermediária que separa o domínio de ligação da DNA polimerase β do domínio da PARP (domínio BRCT-I), sendo esta região parte do sítio de interação com a APE1. A habilidade da XRCC1 em interagir com a endonuclease pode estar alterada na presença do polimorfismo, o que pode influenciar na eficiência do reparo por via BER (MATEUCA *et al.*, 2005). A presença simultânea desse polimorfismo e de outro no gene da APE1 aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer pancreático (JIAO *et al.*, 2006).

A presença do alelo variante *194Trp* no gene *XRCC1* está associado a diversas doenças malignas. Os genótipos variantes (*194Arg/Trp* e *Trp/Trp*) estão associados com risco aumentado em mais de cinco vezes ao desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda em crianças do sexo feminino (BATAR *et al.*, 2009). Associações do alelo *194Trp* também foram

observadas com o risco de câncer colo-retal (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000), carcinoma de nasofaringe (YANG *et al.*, 2007) e câncer oral (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Ao mesmo tempo, esse alelo variante (*194Trp*) também foi indicado como um fator de proteção para diversos cânceres, como linfoma de Burkitt (CELKAN *et al.*, 2008) e linfoma não-Hodgkin (SHEN *et al.*, 2007). Dados contraditórios nos estudos epidemiológicos podem ser resultados de diversos fatores como etnicidade, diferentes padrões de exposição a carcinógenos, combinações de variantes de susceptibilidade ou o número de pacientes (BATAR *et al.*, 2009).

A variação no éxon 10 referente ao códon 399 leva a uma mudança de nucleotídeos de arginina para glicina no lado COOH-terminal do domínio de interação com a PARP, dentro do domínio BRCT-I (SHEN; JONES; MOHRENWEISER, 1998). Essa mudança de aminoácido está associada a várias alterações fenotípicas incluindo sensibilidade maior a mutágenos, aumento de adutos de aflotoxina B₁, mutações na glicoforina A e adutos de polifenóis em tecidos humanos, além de um aumento na frequência de trocas de cromátides irmãs em linfócitos (KELSEY *et al.*, 2004; VODICKA *et al.*, 2004).

O genótipo variante homozigoto para a glicina apresentou associação a um risco maior para o câncer de mama em mulheres com maior nível plasmático de hormônios sexuais de ligação à globulina (SHU *et al.*, 2003). O alelo *399Gln* também se mostrou associado ao risco de câncer colo-retal (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000), câncer oral (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006) e carcinoma de células renais (HIRATA *et al.*, 2006).

Estudos da XRCC1 variante no códon 399 indicaram uma associação entre o genótipo homozigoto variante e o risco menor a diversos tipos de câncer, como o de bexiga (KELSEY *et al.*, 2004) e o câncer de pele não-melanoma (NELSON *et al.*, 2002). Acredita-se que essa proteína alterada e sua conseqüente capacidade reduzida de reparo do DNA poderiam induzir no momento da divisão celular um aumento de apoptose resultante de dano, o que justificaria esses resultados (KELSEY *et al.*, 2004, NELSON *et al.*, 2002).

López-Cima *et al.* (2007) demonstraram a ausência de associação entre o polimorfismo *Arg399Gln* e o risco ao câncer de pulmão, mas o genótipo *399Gln/Gln* mostrou um risco aumentado não significativo entre fumantes leves. A presença do alelo *399Gln*, estando associada a um aumento da sensibilidade a mutágenos, corrobora com o risco aumentado a cânceres relacionados ao tabaco, como, por exemplo, o câncer de pulmão, entre fumantes leves. Ao mesmo tempo, os portadores de *Gln/Gln* apresentaram níveis mais elevados de adutos no DNA que os *Arg/Arg* entre pessoas que nunca fumaram, entretanto níveis menores de adutos no DNA entre fumantes crônicos. Acredita-se que um aumento de

danos ao DNA resultante do fumo pesado possa aumentar a apoptose na divisão celular e se manifestar como risco menor ao câncer induzido por exposição (HUNG *et al.*, 2005).

1.4.2 Gene *XRCC3*

O gene *XRCC3* (do inglês *X-ray repair cross-complementing group 3*) foi primeiramente mapeado ao cromossomo humano 14q32.3 (Figura 8) por Tebbs *et al.* (1995). Apresenta sete éxons e codifica uma proteína de 346 aminoácidos participante do reparo recombinacional homólogo de quebras de fita dupla de DNA (MILLIKAN *et al.*, 2005; TEBBS *et al.*, 1995). Apesar de não ser considerado um grande fator de risco ao câncer, representa um gene de baixa penetrância na susceptibilidade ao câncer (HAN *et al.*, 2006).

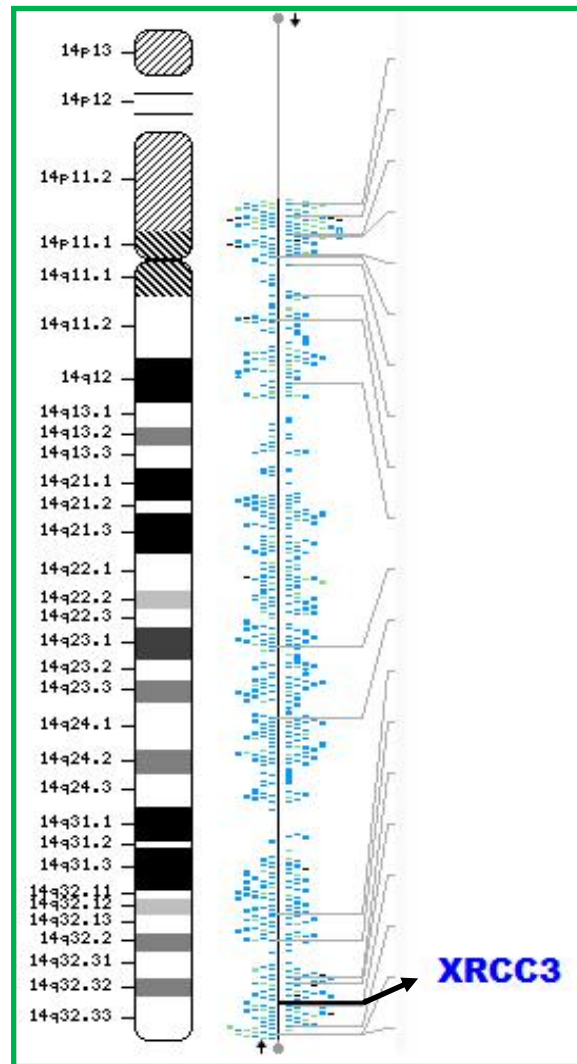


Figura 8 - Localização cromossômica do gene *XRCC3*. Fonte: NCBI Map Viewer adaptado.

Um grande número de estudos moleculares epidemiológicos já foi realizado para avaliar o papel dos polimorfismos no gene *XRCC3* em várias neoplasias. A transição de C para T no éxon 7 (C18067T, rs861539) é o polimorfismo mais intensamente investigado em vista da substituição resultante de treonina para metionina na posição 241 (*Thr241Met*) (HAN *et al.*, 2006).

A substituição do alelo C pelo T nessa posição nucleotídica 18067 acarreta na troca de aminoácidos de treonina para metionina na posição 241 da proteína. Isso significa que um resíduo neutro hidrofílico com um grupo hidroxila é substituído por um hidrofóbico com um grupo metil-sulfidril, o que pode resultar numa mudança substancial na estrutura e função da proteína (JIAO *et al.*, 2008; WINSEY *et al.*, 2000). Além disso, esse sítio polimórfico está localizado em uma região funcional da proteína *XRCC3* do reparo por

recombinação homóloga, a região de ligação da proteína RAD51C (KURUMIZAKA *et al.*, 2003).

Em um estudo de associação entre polimorfismos de genes de reparo de DNA e o desenvolvimento de melanoma maligno, Winsey *et al.* (2000) verificaram que a presença do alelo variante T está significativamente associada ao desenvolvimento do melanoma, com um risco relativo de mais de 2 vezes, comparativamente aos indivíduos que não apresentam esse alelo. Esse mesmo alelo T também se mostrou associado a um risco relativamente maior ao câncer de pulmão com um risco relativo de 1,54 para heterozigotos e de 1,46 para homozigotos (JACOBSEN *et al.*, 2004).

Indivíduos homozigotos para a metionina (alelo T) também apresentaram um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de mama comparativamente aos homozigotos para a treonina (alelo C) (KUSCHEL *et al.*, 2002). A avaliação da combinação de genótipos em vários genes de reparo de quebra de fita dupla, incluindo a mudança *Thr241Met* no *XRCC3*, indicou que mulheres com duas a quatro variações nesses genes apresentaram associação positiva entre um aumento da exposição à radiação de baixa dose e o risco ao câncer de mama (MILLIKAN *et al.*, 2005).

Andrew *et al.* (2008) verificaram uma associação entre o genótipo homozigoto variante *241Met/Met* e o risco de câncer de bexiga aumentado em quase duas vezes em fumantes, comparativamente ao genótipo selvagem (*241Thr/Thr*). Uma associação positiva entre esse polimorfismo *241Met* no *XRCC3* e o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço foi encontrada, indicando um risco relativo de 1,96 vezes (WERBROUCK *et al.*, 2008).

A avaliação da associação desse mesmo polimorfismo com o desenvolvimento da leucemia mielóide aguda demonstrou que a presença concomitante da variante *241Met* no *XRCC3* e de um polimorfismo no gene *RAD51* resulta num aumento do risco de desenvolvimento dessa doença. Quando considerada a deleção do gene de detoxificação *GSTM1* juntamente com as variantes dos genes *XRCC3* e *RAD51*, o risco é aumentado em mais de 15 vezes (SEEDHOUSE *et al.*, 2004).

Apesar de resultados que comprovam a associação desse polimorfismo com o risco de desenvolvimento de neoplasias, existem também trabalhos que supõem que o polimorfismo *Thr241Met* não desempenharia um papel fundamental na etiologia de alguns tipos de câncer. Os genótipos variantes *241Thr/Met* e *Met/Met*, comparativamente com o genótipo *241Thr/Thr*, não se apresentaram associados a um risco aumentado para o câncer gástrico. É muito provável que várias variantes ou polimorfismos de susceptibilidade comuns

em genes de reparo, e não somente um só, possam contribuir conjuntamente para a susceptibilidade ao câncer gástrico, como também a outras neoplasias (SHEN *et al.*, 2004).

O polimorfismo *Thr241Met* também não estaria associado ao risco de desenvolvimento de câncer de pulmão e, além disso, o genótipo *241Met/Met* representaria um menor risco ao carcinoma de células escamosas (LÓPEZ-CIMA *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos avaliaram polimorfismos no gene *XRCC3* em regiões intrônicas, como a mudança nucleotídica de A para G na posição 17893 no íntron 6 (rs1799796). Entretanto, os resultados são mais conflitantes do que conclusivos (HAN *et al.*, 2006).

1.5 Gene *GSTM1*

As reações de fase I e de fase II são biotransformações de substâncias químicas que ocorrem durante o metabolismo, principalmente hepático, no retículo endoplasmático liso de células epiteliais do trato gastrointestinal, dos pulmões, rins e pele, além dos hepatócitos (KATZUNG, 2007). A primeira linha de defesa do corpo contra o câncer são essas enzimas, que são essenciais para a proteção contra carcinógenos presentes na dieta e no ambiente e contra espécies reativas de oxigênio endógenas e exógenas (TALALAY *et al.*, 1995).

Em geral, os carcinógenos são oxidados em intermediários reativos por enzimas de fase I (p. ex. CYPs), enquanto que as enzimas de fase II medeiam a conjugação desses metabólitos com substratos endógenos hidrofílicos. As glutathione S-transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas de fase II que catalisam a conjugação de intermediários reativos eletrófilos, por exemplo, os xenobióticos, com a forma reduzida nucleofílica da glutathione, protegendo macromoléculas celulares do ataque desses compostos eletrófilos reativos (Figura 9) (HUBER & ALMEIDA, 2008; SILVA *et al.*, 2008; TOWNSEND; TEW, 2003).

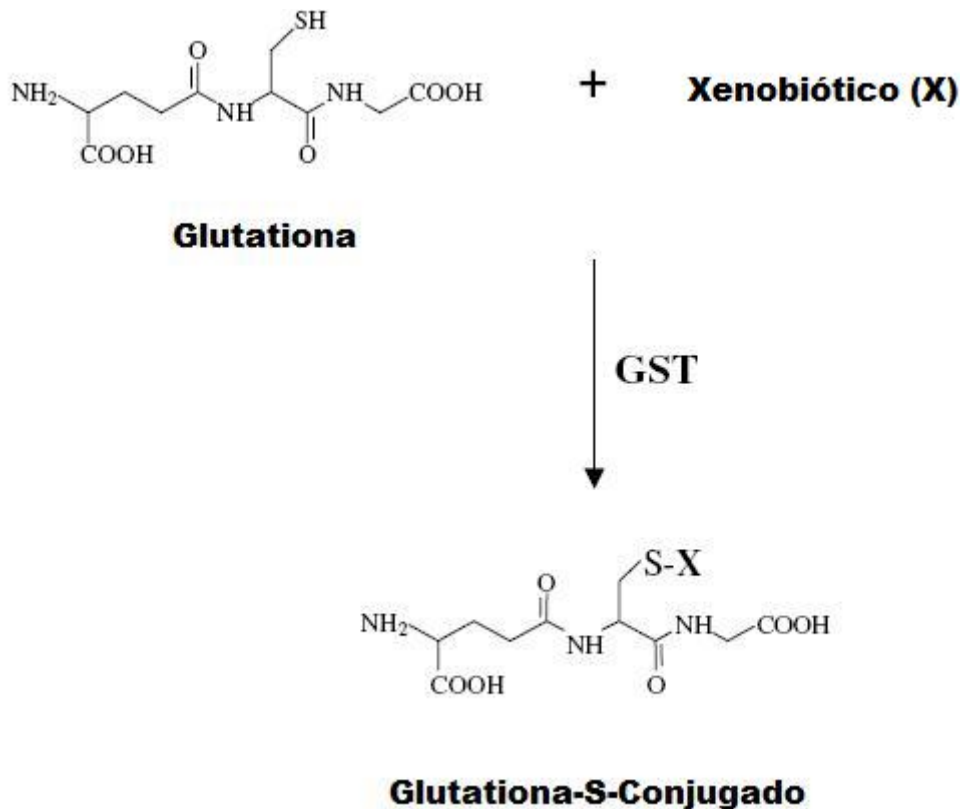


Figura 9 - Conjugação da glutathiona a um xenobiótico (X) via GST resulta na formação de um conjugado S-glutathiona. Fonte: Modificada de Townsend e Tew, 2003.

Essas enzimas participam da defesa contra o dano oxidativo e desempenham um papel importante na detoxificação de compostos endógenos e exógenos, que, se não metabolizados, podem reagir com o DNA formando adutos. Estes, se não reparados, podem eventualmente produzir mutações em células somáticas, induzir um crescimento celular desregulado e promover o desenvolvimento do câncer (MILLER; MOHRENWEISER; BELL, 2001).

As GSTs de mamíferos podem ser divididas em três grandes famílias: GSTs citossólica, mitocondrial e microsomal. As GSTs citossólicas são todas diméricas, contendo de 199 a 244 resíduos de aminoácidos em suas estruturas primárias. Nesse grupo, de acordo com a similaridade da seqüência de aminoácidos, oito classes são descritas: alfa (A), kapa (K), mu (M), pi (P), teta (T), ômega (O) e zeta (Z), incluindo várias subfamílias para cada classe, como M1 a M5 (HUBER & ALMEIDA, 2008; MILLER; MOHRENWEISER; BELL, 2001).

A enzima GSTM1, assim como as outras da classe mu (M), é codificada no cromossomo 1p13.3 (Figura 10) e o gene referente é composto por 8 éxons. Essa classe

desempenha funções na detoxificação de compostos eletrofílicos, incluindo carcinógenos, fármacos, toxinas ambientais e produtos de estresse oxidativo e se apresentam altamente polimórficas. Essas variações genéticas podem alterar a susceptibilidade individual a toxinas e carcinógenos, assim como afetar a eficácia e toxicidade de alguns fármacos (NCBI, 2008).

Inúmeros polimorfismos em GSTs foram identificados, incluindo aqueles que resultam em alelos deletados ou não-funcionais, como, por exemplo, em *GSTM1* e *GSTT1*. É estimado que, na população branca, 45 a 50% são homozigotos para a deleção de *GSTM1*, os chamados *GSTM1*-nulos (FRENCH *et al.*, 2005; MILLER; MOHRENWEISER; BELL, 2001; XU *et al.*, 1998). Cotton *et al.* (2000), em uma revisão, compilou as frequências do genótipo *GSTM1*-nulo em populações por todo o mundo e esta variou de 23 a 62%.

O mecanismo envolvendo a deleção do *GSTM1* foi sugerido por Pearson *et al.* (1993) e caracterizado por Xu *et al.* (1998) e aparentemente resulta de um desigual *crossing-over* homólogo entre duas regiões altamente idênticas que flanqueiam o gene *GSTM1*, resultando em uma deleção de 15 kb contendo todo o gene *GSTM1*.

Indivíduos com o gene *GSTM1* deletado, por não metabolizarem alguns carcinógenos ativos e toxinas ambientais, parecem ter um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer, especialmente o de bexiga e o de pulmão (NCBI, 2008; SILVA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2006; MILLER; MOHRENWEISER; BELL, 2001).

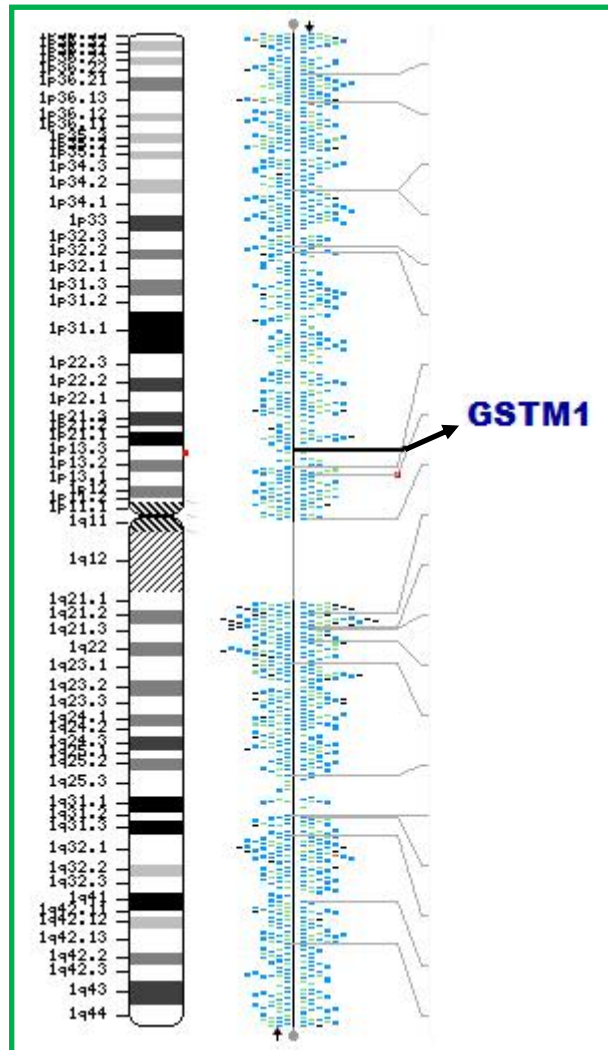


Figura 10 - Localização cromossômica do gene *GSTM1*. Fonte: NCBI Map Viewer adaptado.

A associação entre o *GSTM1* e o câncer de pulmão foi explicitada por um aumento do dano citogenético em fumantes crônicos deficientes em *GSTM1* (van POPPEL *et al.*, 1992) e uma susceptibilidade maior a este tipo de câncer entre fumantes *GSTM1*-nulos (SEIDEGARD *et al.*, 1990). Além disso, um estudo de caso-controle demonstrou que o genótipo *GSTM1*-nulo apresenta um risco para o adenocarcinoma de pulmão em mais de 3 vezes (GAO & ZHANG, 1999).

A ausência do gene *GSTM1*, por ser um fator de risco ao câncer, já se mostrou relacionada aos adenocarcinomas de estômago e cólon, em que o risco relativo para o desenvolvimento desses cânceres apresentou-se 3 vezes maior relativamente ao fenótipo nulo (STRANGE *et al.*, 1991). Trizna *et al.* (1995) indicou um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço para o genótipo de ausência do gene *GSTM1*,

o que também foi sugerido por Gattás *et al.* (2006) e Gronau *et al.* (2000), além de um risco aumentado para o câncer oral e o de faringe (GATTÁS *et al.* 2006).

A formação de adutos em proteínas plasmáticas e adutos aromáticos no DNA por poluentes ambientais também é modulada por polimorfismos nos genes que codificam enzimas de metabolismo. Godschalk *et al.* (2001) demonstraram, em um estudo com 67 fumantes, que os níveis de adutos no DNA se apresentaram maiores para os indivíduos GSTM1-nulos em relação aos GSTM1 não-nulos. Além disso, há um risco na combinação dos genótipos de *GSTM1* com os de *NAT1* e *NAT2* (N-acetil-transferases 1 e 2), em que se observou um nível mais elevado de adutos em indivíduos acetiladores lentos para *NAT1* e *NAT2*/GSTM1-nulos relativamente a acetiladores rápidos para *NAT1* e 2/GSTM1 não-nulos, indicando a importância da análise simultânea de genótipos para uma melhor identificação de indivíduos com risco maior ao câncer.

Em um estudo com irradiação por raios gama, a análise do dano ao DNA residual após o reparo pelas células demonstrou que o hábito de fumar e o genótipo de presença ou ausência do gene *GSTM1* podem ter efeitos moduladores na capacidade individual ao reparo do DNA. Os resultados indicaram que não-fumantes apresentaram um dano residual ao DNA maior que os fumantes, além de que os indivíduos GSTM1-positivos apresentaram uma frequência maior de aberrações cromossômicas induzidas por radiação quando comparados com os GSTM1-nulos. Pode-se supor que tanto os fumantes crônicos como os GSTM1-nulos apresentam uma maior expressão de enzimas envolvidas no reparo de dano oxidativo, em vista de um estresse oxidativo crônico pelo fumo e pela detoxificação ineficiente de espécies reativas de oxigênio na ausência do *GSTM1* (MARCON *et al.*, 2003).

1.6 Populações estudadas

O presente trabalho se baseou na ocorrência de reservas de urânio na borda da bacia amazônica na mesorregião do Baixo Amazonas, no Estado do Pará, mais especificamente no município de Monte Alegre. Segundo a Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM), vinculada ao Ministério de Minas e Energia, a região compreende a maior área de mineração de urânio do mundo, superior a 800 Km², que se estende aos municípios de Alenquer e Prainha (Figura 11).

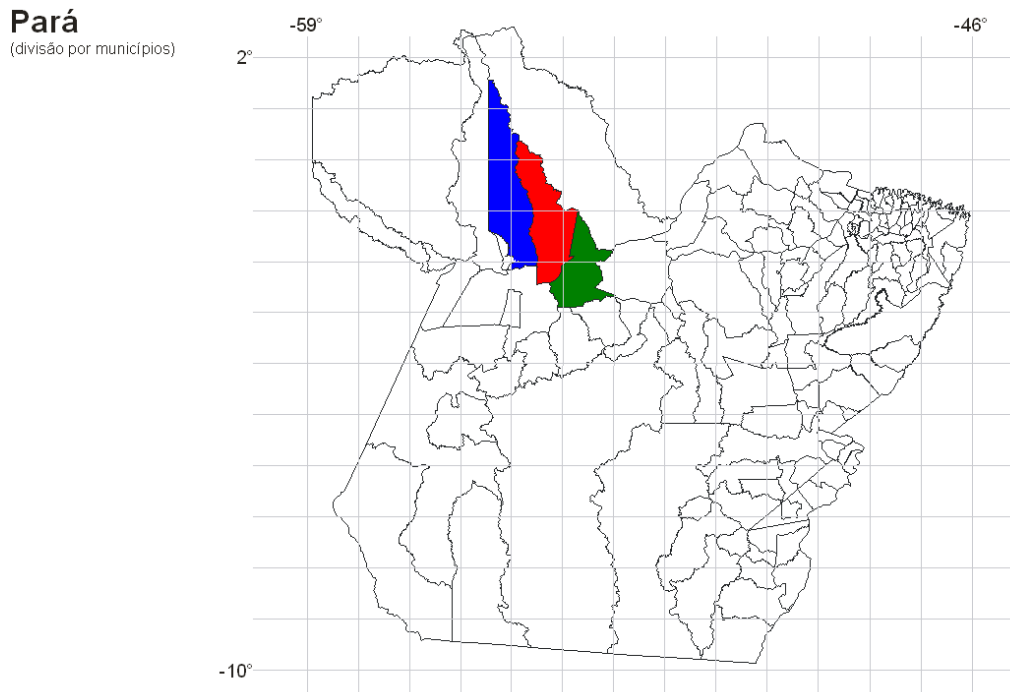


Figura 11 - Localização dos municípios de Monte Alegre (em vermelho), Alenquer (em azul) e Prainha (em verde). Fonte: IBGE (2008a), adaptado.

O município de Monte Alegre está localizado na porção noroeste do Estado do Pará a uma latitude de 02° 00' 28" sul e longitude de 54° 04' 09" oeste e está a uma altitude de 38 metros. Limita-se com os municípios de Almeirim, Prainha, Santarém e Alenquer e possui um território de 21.703 Km². A cidade de Monte Alegre, com uma população atual de cerca de 37.000 habitantes, é uma das mais antigas povoações da Amazônia, sendo a presença humana na região estabelecida em cerca de 10 mil anos antes do presente. Atualmente ainda é possível a observação de registros arqueológicos desses primeiros habitantes, no sítio de Pedra Furada, Monte Alegre (PA). Durante o período da conquista da Amazônia, principalmente por portugueses, um importante número de religiosos estabeleceu-se na região com o objetivo de catequese dos povos indígenas. A missão religiosa Capuchos da Piedade catequizou os índios da aldeia de Gurupatuba, originando o atual município (CPRM, 1998; IBGE, 2008b, 2008c; ROOSEVELT, 1997).

O município de Alenquer se localiza a uma latitude de 01° 56' 30" sul e longitude de 54° 44' 18" oeste e a uma altitude de 52 metros. Os municípios limítrofes são Almeirim, Óbidos, Prainha e Santarém. Possui uma população de aproximadamente 55.680 habitantes residentes em uma área de 22.282 Km² (IBGE, 2008b, 2008c).

Prainha é um município menor localizado a uma latitude de 01° 48' 00" sul e longitude de 53°28'48" oeste, estando a uma altitude de 70 metros. Apresenta divisas com os municípios de Monte Alegre, Almerim, Porto de Moz, Medicilândia, Uruará e Santarém. Seu território apresenta uma área de 12.599 Km² e a população está em torno de 26.800 pessoas (IBGE, 2008b, 2008c).

Desde 1977, levantamentos radiométricos e caracterizações geológicas realizadas pela CPRM revelaram ocorrência de urânio em uma área localizada a cerca de 20 Km da cidade de Monte Alegre, em vista de afloramentos minerais ocorridos numa formação geológica denominada Barreirinha. Nessa região, foi instalado um assentamento agrícola na década de 50, denominado oficialmente de Colônia Agrícola Nacional do Pará (CANP), também conhecido como Inglês de Souza – referindo-se ao nome do implantador do assentamento – e hoje é um pequeno povoado (localização 1° 56 '40,1" sul e 54° 12' 49,7" oeste). A Figura 12 demonstra a área uranífera em marrom que foi delimitada pelo mapeamento radiogeológico. (MELO, 1999).

A presença desta ocorrência uranífera foi investigada pela Nuclebrás, atual Indústrias Nucleares Brasileiras (INB), com o objetivo de avaliar a viabilidade econômica deste depósito. Nessa ocasião, verificou-se que o urânio está presente em maior abundância nos folhelhos negros, porém com baixos teores (35 ppm de U₃O₈) e em menor abundância nos veios de brechas lateríticas, apresentando entretanto teores mais elevados [100 – 3600 ppm de U₃O₈], porém inviáveis para um aproveitamento comercial. A partir de 1982, a população da cidade de Monte Alegre fez a retirada de alguns fragmentos de rocha das reservas de urânio localizadas a apenas 20 metros de profundidade, para a construção de calçadas, pisos e residências (MELO, 1999).

Durante o período de 1995 a 1999, medidas de radiação gama foram realizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), que obteve valores da ordem daqueles observados, por exemplo, na cidade do Rio de Janeiro. A CNEN julgou não ser necessário recomendar nenhuma ação remediadora, considerando os resultados obtidos neste estudo.

Por outro lado, no ano 2000, uma pesquisa desenvolvida em Monte Alegre pela UFPA concluiu o contrário, ou seja, a população corria risco de contaminação radioativa, e esta seria uma das causas do possível aumento de casos de câncer entre a população local.

Em pelo menos um ponto, no entanto, as duas investigações concordaram: são necessárias novas pesquisas para se chegar a uma conclusão definitiva sobre o assunto. Os ensaios cromossômicos são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação da atividade biológica, sendo utilizados e recomendados

por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisa dos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa. Basicamente, esses ensaios avaliam o dano causado ao DNA pelo material em teste na presença ou ausência de sistemas metabólicos de ativação e têm por objetivo avaliar o risco potencial que os agentes tóxicos, como radiação, metais pesados e pesticidas, representam para a saúde humana (BRUSICK, 1991).

Para uma abordagem direta e confiável dos possíveis danos à saúde das populações expostas e para uma avaliação da susceptibilidade à radiação ionizante inerente a estas, este trabalho realizou um estudo de biomonitoramento genotóxico e genético.

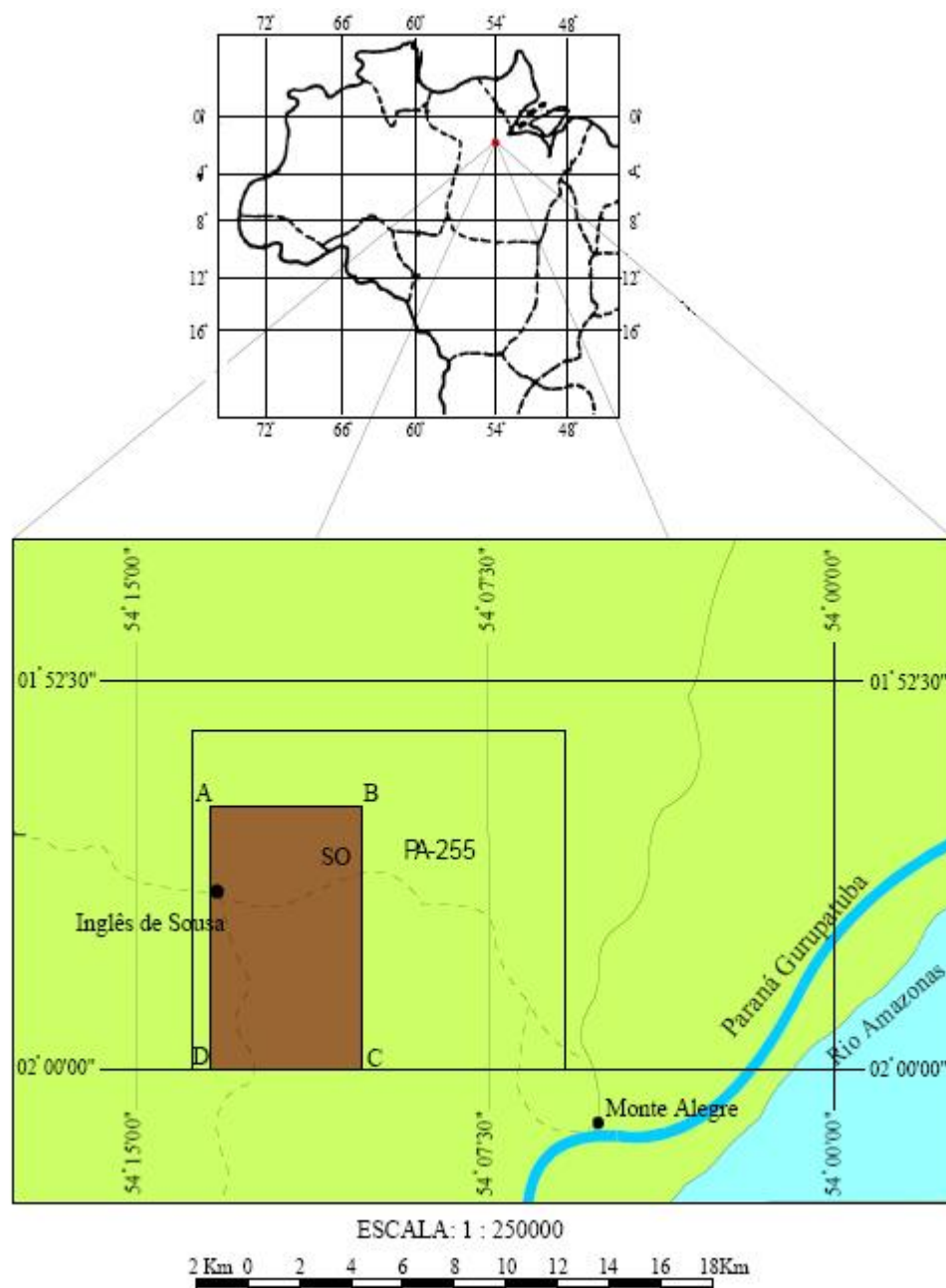


Figura 12 - Limites geográficos de ocorrência de urânio na região de Inglês de Souza (PA) (região de cor marrom). Fonte: MELO, 1999.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho visou avaliar a genotoxicidade e a presença de polimorfismos nos genes de reparo do DNA *XRCC1* e *XRCC3* e de metabolização *GSTM1* nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer expostas ao urânio no estado do Pará.

2.2 Objetivos Específicos

❖ Estabelecer a incidência de dano ao DNA por exposição à radiação de urânio nos linfócitos periféricos das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer (Estado do Pará) pelo Ensaio do Cometa;

❖ Determinar, através de seqüenciamento direto, novas alterações genéticas e a frequência de SNPs relacionados à susceptibilidade a radiação do urânio já descritos nos genes de reparo de DNA *XRCC1* e *XRCC3* e no gene de metabolização *GSTM1*;

❖ Avaliação da associação entre os genótipos de reparo de DNA nos genes *XRCC1* e *XRCC3* e de metabolismo no gene *GSTM1* e o nível de dano ao DNA em linfócitos periféricos de indivíduos das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O protocolo seguido foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical – UFPA (Nº 002/2007-CEP/NMT), tendo sido aprovado e conduzido de acordo com a Resolução 196/96 do CNS/MS.

3.2 Caracterização das Amostras Populacionais

No presente trabalho, sob consentimento livre e esclarecido, as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer do estado do Pará foram amostradas como descrito a seguir (Tabela 1), totalizando 160 indivíduos, não aparentados. Serão referidos como população do município de Monte Alegre, os indivíduos amostrados da Colônia Agrícola Nacional do Pará (CANP).

Para uma análise epidemiológica, foi utilizada uma versão modificada do questionário da Comissão de Proteção contra Mutágenos e Carcinógenos Ambientais (CARRANO; NATARAJAN, 1988), que foi aplicada aos voluntários abordando questões sobre seus hábitos, idade, antecedentes ou qualquer outro fator que poderia ter influenciado nos resultados da pesquisa, assim abordando:

- ❖ Dados Pessoais;
- ❖ Dados de Ocupação Profissional;
- ❖ Histórico de Exposição;
- ❖ Tabagismo;
- ❖ Alcoolismo;
- ❖ Avaliação da Saúde;
- ❖ Avaliação Nutricional;
- ❖ Histórico Genético.

Foram considerados como grupo controle negativo 6 voluntários não-expostos residentes em Fortaleza, estado do Ceará.

A seleção de voluntários, tanto do grupo controle negativo como das três populações estudadas, obedeceu aos critérios descritos abaixo.

Tabela 1 - Amostragem realizada para as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

<i>População</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>	<i>Total</i>
<i>Monte Alegre</i>	16	48	64
<i>Prainha</i>	10	38	48
<i>Alenquer</i>	17	31	48
<i>Total</i>	43	117	160

3.3 Seleção de voluntários

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

➤ Critérios de Inclusão:

- Morar na região por mais de um ano;

➤ 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.

3.4 Obtenção das amostras

3.4.1 Coleta de sangue periférico

Para o presente estudo, foram coletados 5 mL de sangue periférico de cada um dos 160 indivíduos distribuídos pelas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer, como descrito na tabela 1. Esse procedimento foi realizado por venopunção das veias periféricas usando-se tubos vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante (Tubos BD Vacutainer® EDTA), tomando todos os cuidados necessários de assepsia e desinfecção da área.

As amostras foram transportadas para o laboratório em recipientes com gelo e processadas dentro de 2h após a coleta. Do volume de sangue total obtido, foram separadas duas alíquotas para diferentes procedimentos: os primeiros 3 mL para o isolamento de linfócitos destinados à realização do ensaio do cometa alcalino e o volume restante para o procedimento de extração do DNA e, subseqüentemente, seqüenciamento direto de cada amostra.

O isolamento dos linfócitos foi realizado em um laboratório na cidade de Monte Alegre e subseqüentemente as amostras foram seguidas para o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará para a realização do ensaio do cometa alcalino. As alíquotas de cada população destinadas à extração de DNA foram transportadas em gelo para o Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará.

3.4.2 Isolamento dos linfócitos

Do total de 160 indivíduos, foram selecionadas 77 amostras (39 de Monte Alegre, 21 de Prainha e 17 de Alenquer) relacionadas a indivíduos com ausência total ou recente de histórico de fumo. A cada 3 mL de sangue total, foram acrescentados 5 mL de PBS. Em seguida, centrifugou-se em 3 mL de Ficoll (Histopaque® 1077; Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis) por 30 minutos a 1500 rpm para o isolamento em gradiente dos linfócitos. Subseqüentemente, foi feita a aspiração dos linfócitos presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro (“nuvem de linfócitos”), tendo sido transferida para outro tubo. Foi acrescentado PBS até o volume de 11 mL, seguido de centrifugação por 20 minutos a 1000rpm. Posteriormente, o

sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuspendido em 2 mL de meio a 4°C (40% RPMI, 50% soro fetal bovino e 10% DMSO) como descrito por Knudsen *et al.* (2005) e Pitarque *et al.* (1999). Alíquotas de 1 mL da suspensão de linfócitos foram transferidas para tubos de eppendorfs, que foram colocados em freezer a -26 °C por aproximadamente 1 h e, em seguida, transferidos e estocados em nitrogênio líquido a fim de serem encaminhados para o Laboratório de Oncologia Experimental na Universidade Federal do Ceará. As amostras foram transportadas em gelo seco e mantidas a -180 °C até a realização do ensaio do cometa.

3.5 Viabilidade celular por Exclusão de Azul de Tripán

Previamente a realização do ensaio do cometa alcalino, foi realizado o teste de exclusão por azul de tripán para averiguação da viabilidade celular após o processo de criopreservação, em que a porcentagem de células vivas deveria estar acima de 70% para continuidade da análise. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripán para fora, sendo possível, dessa maneira, observar uma coloração azulada nas células metabolicamente inativas, mortas.

A uma alíquota de 90 µL da suspensão de células foram adicionados 10 µL de azul de tripán 0,4%. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer e a porcentagem de células viáveis calculada.

3.6 Ensaio do Cometa Alcalino

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). Lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMP) a 1 % a 60 °C e mantidas a temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Alíquotas de 20 µL de linfócitos foram adicionadas a 110 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 0,75 % e imediatamente espalhadas pelas lâminas anteriormente mencionadas. Em seguida, lamínulas foram posicionadas sobre as lâminas para uniformizar a distribuição do material e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Posteriormente, as lâminas foram

incubadas em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, Tris 10 mM, EDTA 100 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10) a 4 °C por no mínimo 1 h para ruptura de membranas celulares e remoção de proteínas, deixando o DNA em forma de nucleóides. Após o procedimento de lise, as lâminas foram neutralizadas por 15 minutos em solução de neutralização (Tris 4 M, pH 7,5) e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese. Esta foi preenchida com tampão de eletroforese a 4 °C (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH ~ 13) para cobrir as lâminas por 20 minutos, permitindo o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida por 20 minutos, usando 25 V (volts) e corrente de 300 mA. Todos os passos acima foram realizados em baixa luminosidade para prevenir dano adicional ao DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização durante 10 minutos para neutralizar a alcalinidade.

3.6.1 Análise dos dados

As lâminas foram fixadas em etanol 100%. Posteriormente, aplicou-se 30µL da solução de Brometo de Etídio (20µg/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 13). 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 200 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.*, 1995, 1997; SILVA *et al.*, 2000).

Amostras de linfócitos isolados dos doadores componentes do controle negativo foram expostas a doxorubicina (0,55 µM) por 3 h antes do mesmo processo de criopreservação e avaliadas como controle positivo.

3.6.2 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média (EPM). 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 4.0.

- 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%)

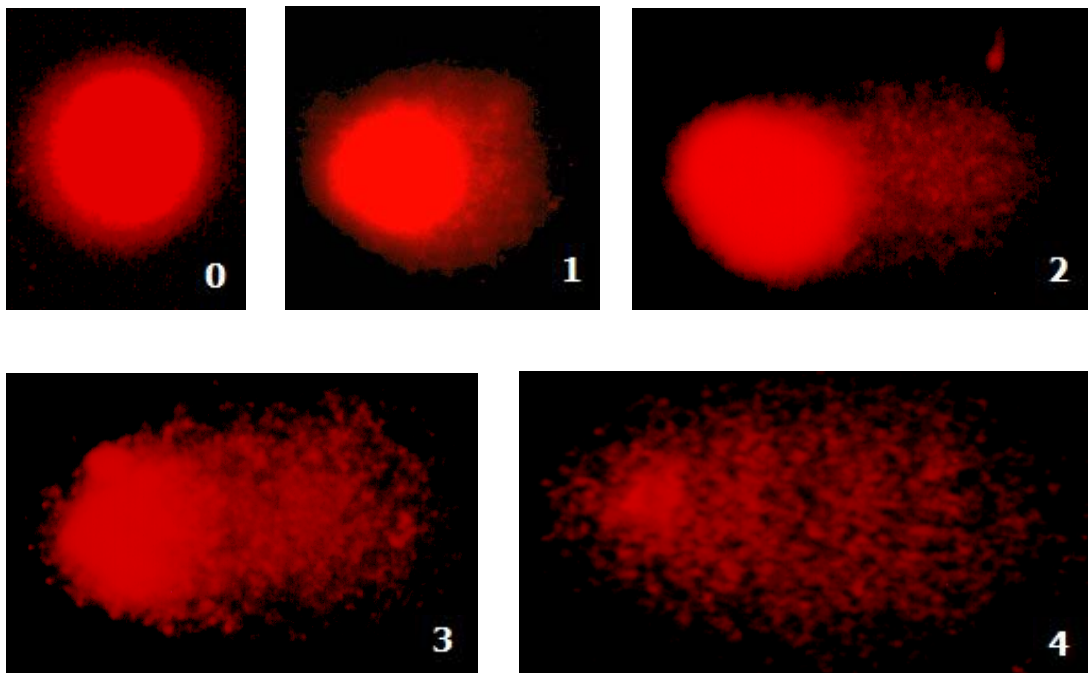


Figura 13 - Tipos de cometas: Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência, sendo indicado o escore atribuído para cada cometa de acordo com o dano. Fonte: Modificada de Speit & Hartmann, 1999.

3.7 Extração de DNA

O material genético foi extraído a partir do sangue total pelo método convencional com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

A primeira etapa do processo consistiu na ruptura das hemácias, em que 1,4 mL da solução de lise (NH_4Cl 100 mM; EDTA 10 mM; NH_4HCO_3 5,8 mM) foram acrescentados em 250 μL de sangue e homogeneizados por inversão de tubo durante 20 minutos. Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos a 13000 rpm. Tendo sido desprezado o sobrenadante (solução + restos orgânicos indesejáveis), o pellet foi lavado e centrifugado até uma completa lise dos eritrócitos.

A segunda fase foi a ruptura da membrana plasmática dos leucócitos. Para tanto, ao pellet formado, foram adicionados 400 μL de solução de lise de leucócitos (Tris-HCl 100 mM; NaCl 200 mM; EDTA 20 mM; SDS 0,5%; pH 8,0). Essa solução foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 55 °C por no mínimo 30 minutos.

Após a retirada das amostras do banho-maria, foram adicionados 500 μL de fenol-clorofórmio (1:1), a mistura foi homogeneizada e agitada suavemente por 10 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 14.000 rpm pelo mesmo tempo. A primeira camada, consistindo de ácidos nucleicos em fenol, foi transferida para outro tubo.

Para a eliminação do fenol da amostra, foi adicionada uma solução de clorofórmio-isopropanol (24:1), homogeneizando-se e agitando-se o tubo suavemente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por igual período de tempo.

Após o tratamento com clorofórmio-isopropanol, seguiu-se à precipitação do DNA. A primeira fase foi transferida para outro tubo e adicionou-se 900 μL de isopropanol, agitando-se suavemente até a observação do precipitado de DNA. O tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado com cuidado, de forma a não perder o pellet. Em seguida, foram adicionados lentamente 300 μL de etanol 70% em cada tubo e, em seguida, o álcool foi descartado.

A extração do material prosseguiu com a hidratação do DNA, em que se utilizou água deionizada estéril, agitando-se até a diluição do material. O material extraído foi deixado em temperatura ambiente por 4 a 6 horas para completa diluição.

Após a extração, foi processada a quantificação do DNA, realizada no espectrofotômetro Gene Quant RNA/DNA da Pharmacia Biotech, na faixa de leitura de 260nm. O DNA após o processo de quantificação foi diluído para 100 ng/μL.

3.8 Reação em Cadeia pela Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) possibilitou a amplificação dos segmentos de interesse no DNA nuclear. Esse processo seletivo ocorre devido ao uso de iniciadores específicos, ou *primers*, que flanqueiam o DNA molde nas regiões desejadas.

A PCR, neste trabalho, permitiu a amplificação de 4 regiões do DNA nuclear. Os segmentos investigados nos genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3* foram previamente descritos por Hirata *et al.* (2006), englobando, no gene *XRCC1*, os éxons 6 e 10 e íntons 6, 9 e 10; no *XRCC3*, o éxon 7 e o íntron 6. O segmento investigado no gene *GSTM1*, referindo-se aos éxons 6 e 7, foi amplificado com o uso de *primers* descritos por Bell *et al.* (1993). Em seguida, eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para verificação de amplificação, em que indivíduos homozigotos *GSTM1*0/GSTM1*0* não apresentam amplificação pela perda do gene (os denominados *GSTM1*-nulos), enquanto que se observa amplificação da região em indivíduos heterozigotos *GSTM1*0/GSTM1*1* ou homozigotos *GSTM1*1/GSTM1*1*, que apresentam pelo menos um dos alelos do gene.

As reações de amplificação das regiões analisadas foram desenvolvidas para um volume final de 25 μL contendo, aproximadamente 100 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 1,25 mM de cada *primer* e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) e incubadas em termociclador *Gene Amp. PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA).

As condições de PCR e as seqüências dos *primers* utilizados estão descritas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Condições da técnica de PCR

Regiões	Etapas/Tempo					Nº de Ciclos
	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	
<i>GSTM1</i>	95 °C / 4'	94 °C / 1'	58 °C / 1'	72 °C / 2'	72 °C / 60'	35
<i>XRCC1</i>	95 °C / 1'	95 °C / 15''	60 °C / 15''	72 °C / 1'	72 °C / 60'	35
<i>XRCC3</i>	95 °C / 1'	95 °C / 15''	60 °C / 15''	72 °C / 1'	72 °C / 60'	35

Tabela 3 - Sequências dos *primers* utilizados.

Gene	Região	Sequências dos <i>primers</i>	Amplificação
<i>GSTM1</i>	Éxons 6 e 7	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC -3'	175
		5'-GTTGGGCTCAAATAACGGTGG -3'	
<i>XRCC1</i>	Éxon 6	5'-GCCCCGTCCCAGGTA-3'	491
		5'-AGCCCCAAGACCCTTTCACT-3'	
<i>XRCC1</i>	Éxon 10	5'-TCTCCCTTGGTCTCCAACCT-3'	403
		5'-AGTAGTCTGCTGGCTCTGG-3'	
<i>XRCC3</i>	Éxon 7	5'-GGTCGAGTGACAGTCCAAAC-3'	456
		5'-TGCAACGGCTGAGGGTCTT-3'	

3.9 Reação de Seqüenciamento Direto

Após o PCR, as amostras amplificadas foram seguidas para a realização da técnica de seqüenciamento direto que utiliza o princípio da terminalização de cadeia descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

Todos os seqüenciamentos utilizaram o ensaio laboratorial com base no kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* (versão 3.1), que utiliza como enzima a *AmpliTaq® DNA Polymerase* (*Applied Biosystems*, CA, USA). Os *primers* foram os mesmos empregados na etapa da PCR.

A reação se desenvolveu em um volume de 20 µL, contendo 15 µL de água; 1 µL do produto amplificado (PCR); 3,5 µL do Kit *BigDye™ Terminator* (v.3.1); e 0,5 µL do *primer* direto. O programa de ciclagem, descrito na tabela abaixo, foi o mesmo para cada segmento.

Tabela 4 - Condições de ciclagem na técnica de seqüenciamento das regiões estudadas dos genes *GSTM1*, *XRCC1* e *XRCC3*.

Etapas/Tempo				N° de Ciclos
Desnaturaçã Inicial	Desnaturaçã	Anelamento	Extensão	
96 °C / 5'	94 °C / 1'	60 °C / 1'	72 °C / 4'	35

As amostras seqüenciadas foram submetidas à eletroforese no *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, CA, USA). Como resultado, obtivemos as seqüências na forma de cromatografia visualizadas pelo programa *Chromas Pro*, versão 1.33, para posterior análise da presença de alterações nucleotídicas nas regiões estudadas dos genes *XRCC1*, *XRCC3* e *GSTM1*. As seqüências da cada amostra foram impressas e comparadas manualmente com a seqüência de referência para cada segmento estudado dos genes em questão.

3.9.1 Análises Estatísticas

As frequências alélicas e genóticas foram computadas usando o algoritmo de máxima-verossimilhança (EXCOFFIER & SLATKIN, 1995) e avaliadas se em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste exato utilizando-se o método de cadeias de Markov (GUO *et al.*, 1992). O desequilíbrio de ligação foi avaliado pelo algoritmo de maximização de expectativa (E.M.) (SLATKIN & EXCOFFIER, 1996) e a estrutura genética das populações foi analisada utilizando-se AMOVA (Análise de Variância Molecular) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) e pairwise F_{st} (COCKERHAM & WEIR, 1993). Todas as análises foram implementadas no programa Arlequin versão 3.1 (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

As frequências alélicas das três populações foram comparadas pareadamente pelo teste do Qui-Quadrado, considerando-se $p < 0,05$, no programa BioEstat, versão 5.0.

As variáveis epidemiológicas das populações em estudo foram avaliadas pela análise de regressão logística para a obtenção do risco relativo (RR), com um intervalo de confiança de 95%, comparando Monte Alegre às outras duas populações. A associação entre os genótipos presentes nos genes *XRCC1* e *XRCC3* e os índices de dano ao DNA nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer foi realizada através da análise comparativa por regressão logística entre o genótipo selvagem homocigoto *versus* os genótipos variantes homocigoto e heterocigoto. Foram avaliados o éxon 10 (399Arg/Gln) e íntrons 9 e 10 do gene *XRCC1* e íntron 6 e éxon 7 (241Thr/Met) do gene *XRCC3*. O alelo 194Trp (éxon 6) e os genótipos no íntron 6 do *XRCC1* não foram investigados em vista da baixa frequência do genótipo variantes. Em relação ao gene *GSTM1*, a análise baseou-se na comparação entre presença e ausência desse gene e os valores de dano ao DNA. As prevalências dos polimorfismos foram relacionadas aos escores de dano dicotomizados pelo valor médio (ZIJNO *et al.*, 2006). Todas as análises consideraram juntamente 70 indivíduos distribuídos nas três populações (34 de Monte Alegre, 20 de Prainha e 16 de Alenquer). Todas as análises de regressão logística foram realizadas através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 8.0.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das Populações

A análise amostral das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer não englobou 10 dos 160 voluntários iniciais dos quais não foi possível a caracterização genética. Após a aplicação do questionário aos voluntários, a distribuição etária em número de indivíduos para cada município foi obtida como mostrada na figura 14. As faixas entre 20 a 50 anos mostraram-se relativamente homogêneas entre as três populações, em que a faixa de 31 a 40 anos apresentou um menor número de voluntários, aproximadamente 10 indivíduos. Por outro lado, no município de Monte Alegre, o número de 20 indivíduos com idade superior a 50 anos sobressaiu-se em relação a Prainha e Alenquer, que apresentaram 3 e 7 indivíduos, respectivamente.

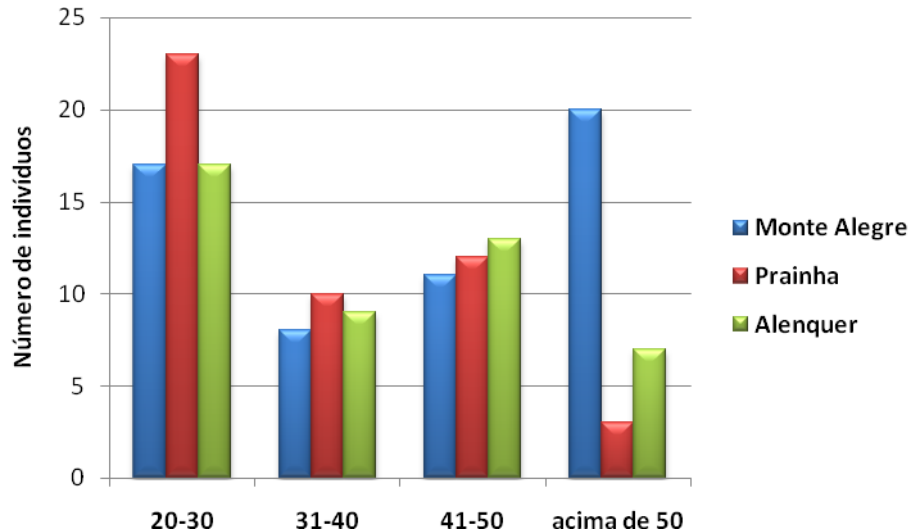


Figura 14 - Distribuição etária em número de indivíduos das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

A distribuição do número de homens e mulheres de Monte Alegre, Prainha e Alenquer indicou, nas três populações, maior número de mulheres, abrangendo 73% dos indivíduos participantes do estudo (Figura 15).

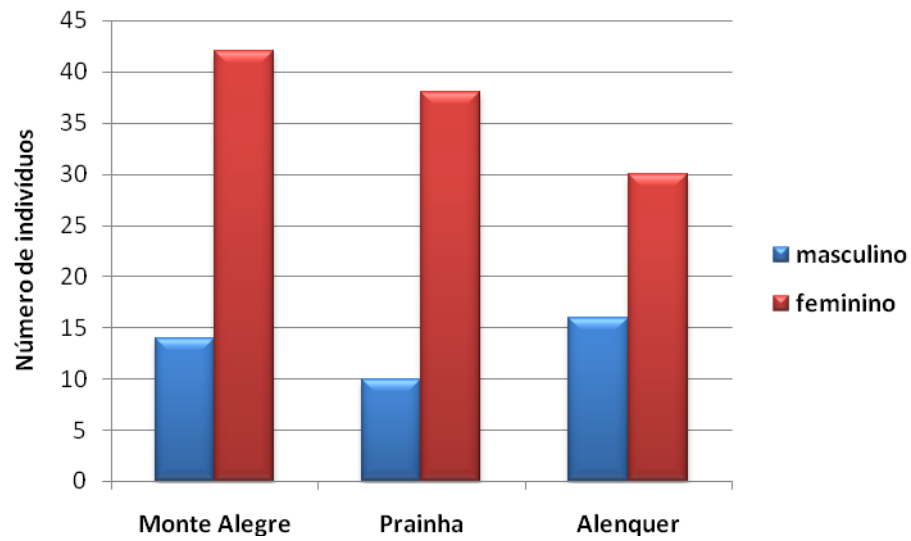


Figura 15 - Distribuição por gênero em número de indivíduos das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

A porcentagem de indivíduos das populações em estudo em cada uma das três categorias de hábito de fumo (nunca fumou, fumante ativo e ex-fumante) está ilustrada na figura 16. Mais da metade dos indivíduos de cada município relataram nunca terem fumado. Os fumantes ativos responderam pela menor frequência dentre as categorias nas populações de Monte Alegre e Alenquer (14% e 13%, respectivamente), enquanto que, em Prainha, esse grupo representou 25% dos entrevistados.

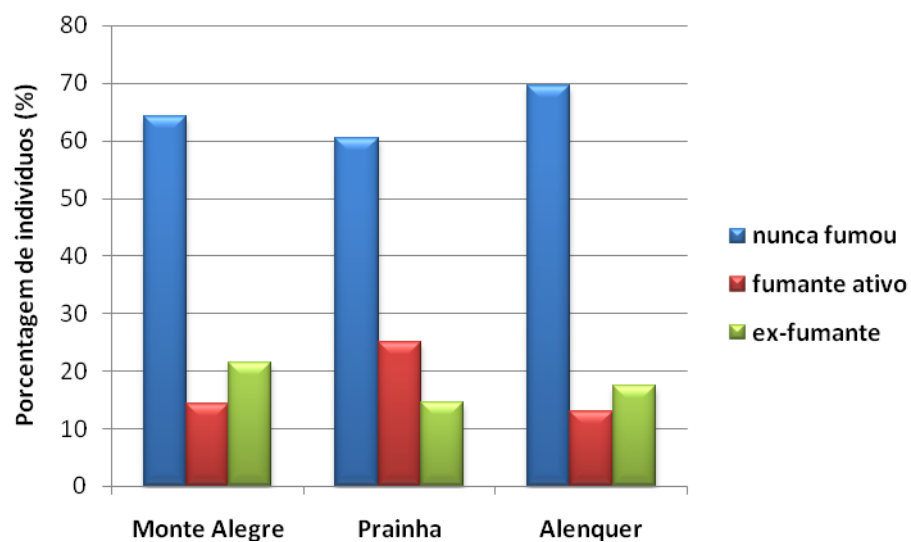


Figura 16 - Distribuição em porcentagem das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer por categorias de hábito de fumo.

As freqüências de câncer e de histórico de câncer familiar do total de voluntários de Monte Alegre, Prainha e Alenquer estão indicadas na figura 17. Foram relatados 4 casos de câncer dentre os 150 voluntários (2 de mama, sendo um em Monte Alegre e um em Prainha, 1 de ânus em Alenquer e 1 de pele em Monte Alegre), enquanto que 97% indicaram a ausência desta em seu histórico de vida. Em relação ao histórico de câncer familiar (relatos da doença nos pais, irmãos ou filhos), este foi relatado por 23 indivíduos, representando 15% do total.

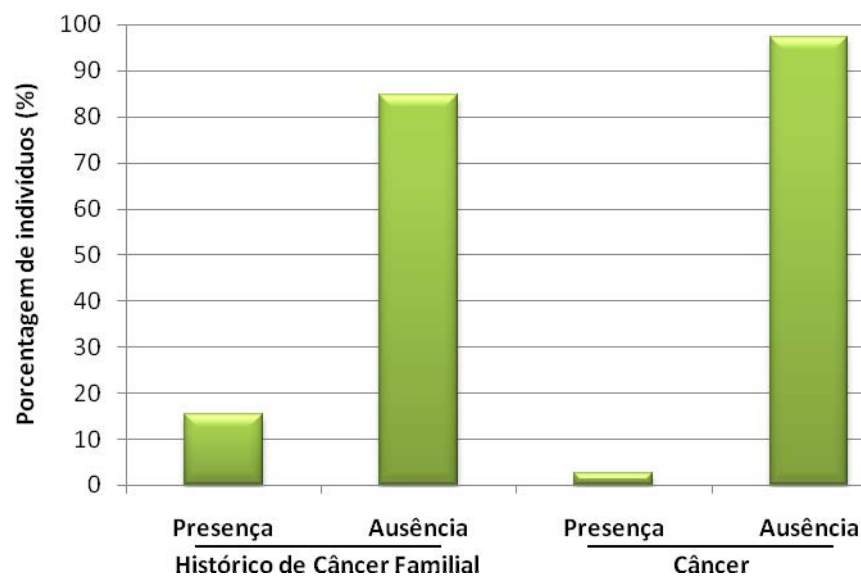


Figura 17 - Freqüências de câncer e de histórico de câncer familiar dos voluntários das três populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

A avaliação dos parâmetros de ocupação profissional e de histórico de exposição indicou que a população de Monte Alegre, referentemente às populações de Prainha e Alenquer, apresentou uma tendência maior a indivíduos que relataram trabalhar ou já terem trabalhado expostos ao sol ($RR = 2,54$; $p = 0,035$), além de uma chance maior de os indivíduos já terem sido expostos aos raios-X para diagnóstico ($RR = 2,18$; $p = 0,047$).

4.2 Biomarcador de Exposição

4.2.1 Viabilidade celular por Exclusão de Azul de Tripán

Através do teste de azul de tripan para a avaliação da viabilidade celular, verificou-se que a porcentagem média de células viáveis após o processo de criopreservação foi de $74,46\% \pm 2,41$, o que possibilitou a análise de danos ao DNA pelo ensaio do cometa alcalino.

4.2.2 Ensaio do Cometa Alcalino

Na análise do cometa alcalino, utilizando-se linfócitos periféricos da amostragem estudada, não houve diferença estatisticamente significativa entre os Índices de Dano (IDs) das populações de Monte Alegre ($ID = 32,01 \pm 1,57$), Prainha ($ID = 45,80 \pm 1,12$) e Alenquer ($ID = 44,30 \pm 0,62$) e o do controle negativo ($ID = 42,00 \pm 5,75$) ($p > 0,05$). Entretanto, o ID de Monte Alegre se apresentou estatisticamente menor em relação aos IDs de Prainha e de Alenquer ($p < 0,001$). Nenhuma das três populações apresentou valores de dano ao DNA equivalentes aos linfócitos tratados com doxorubicina ($ID = 258,25 \pm 5,31$) ($p < 0,001$) (Figura 18).

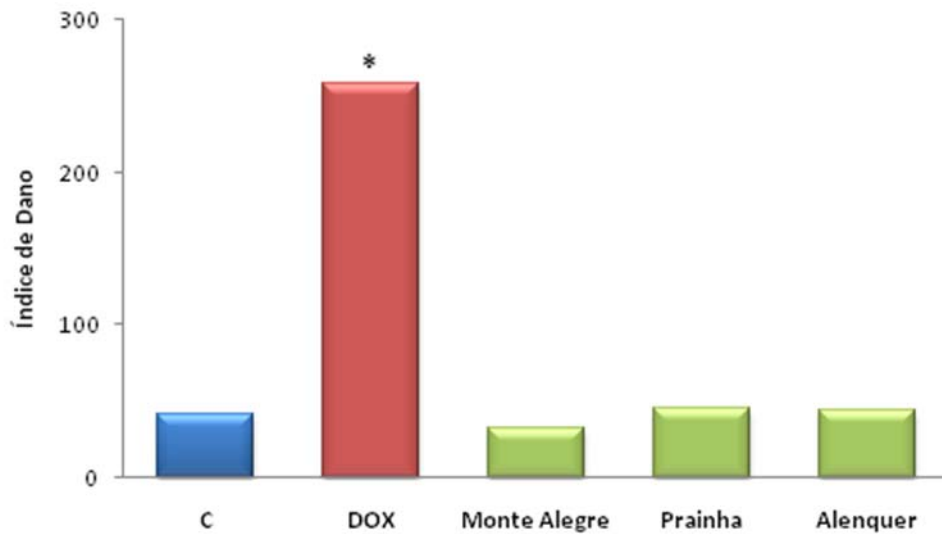


Figura 18 - Análise dos índices de dano ao DNA nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer pelo ensaio do cometa alcalino. Voluntários não-residentes nas três localidades foram selecionados como o controle negativo (C) e o controle positivo (DOX) representa linfócitos expostos a doxorubicina por 3 horas. * $p < 0,001$ em relação ao controle negativo.

4.3 Biomarcadores de Susceptibilidade

4.3.1 Caracterização da amostra

Do total de 160 indivíduos amostrados das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer, não foi possível o seqüenciamento direto dos genes *XRCC1*, *XRCC3* e *GSTM1* de 10 amostras, devido a uma quantidade muito pequena de DNA extraído. As amostras seqüenciadas estão distribuídas nas três populações como mostrado na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição dos indivíduos seqüenciados para os genes de reparo *XRCC1* e *XRCC3* e para o gene *GSTM1* nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

<i>População</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>	<i>Total</i>
<i>Monte Alegre</i>	14	42	56
<i>Prainha</i>	10	38	48
<i>Alenquer</i>	16	30	46
<i>Total</i>	40	110	150

4.3.2 Gene de reparo *XRCC1*

Após o seqüenciamento direto das duas regiões do gene *XRCC1*, englobando os éxons 6 e 10 e íntrons 6, 9 e 10, foi possível a identificação de seis mutações: i) C26304T (rs1799782), presente no éxon 6 e que resulta na troca de aminoácidos de arginina para triptofano na posição 194 (*Arg194Trp*); ii) G26350A (rs1799779), presente no íntron 6; iii) G26529C (rs não determinado), presente também no intron 6; iv) G27980A (rs25486), presente no íntron 9; v) G28152A (rs25487), presente no éxon 10 e que resulta na troca de aminoácidos de arginina para glicina (*Arg399Gln*); vi) C28234T (rs3213368), presente no íntron 10.

4.3.2.1 Frequências alélicas e genotípicas

4.3.2.1.1 Monte Alegre

A distribuição das frequências genotípicas no gene *XRCC1* na população de Monte Alegre não indicou um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$)

para todas as mutações estudadas no gene *XRCCI*. O ponto G26350A (íntron 6) apresentou-se monomórfico, em que todos os indivíduos apresentavam o genótipo selvagem (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo *XRCCI* na população de Monte Alegre.

Frequências	Éxon 6		Íntron 6				Íntron 9		Éxon 10		Íntron 10	
	Arg194Trp		G26350A		G26529C				Arg399Gln			
Genotípica	CC	0,77	GG	1,00	GG	0,87	AA	0,46	GG	0,53	CC	0,58
	CT	0,23	GA	-	GC	0,13	AG	0,45	GA	0,38	CT	0,41
	TT	-	AA	-	CC	-	GG	0,09	AA	0,09	TT	0,01
Alélica	C	0,88	G	1,00	G	0,94	A	0,69	G	0,72	C	0,78
	T	0,12	A	-	C	0,06	G	0,31	A	0,28	T	0,22

4.3.2.1.2 Prainha

A distribuição das frequências genotípicas no gene *XRCCI* na população de Prainha não indicou um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) para todas as mutações estudadas no gene *XRCCI*. O ponto G26529C (íntron 6) apresentou-se monomórfico, em que todos os indivíduos apresentavam o genótipo selvagem (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo *XRCCI* na população de Prainha.

Frequências	Éxon 6		Íntron 6				Íntron 9		Éxon 10		Íntron 10	
	Arg194Trp		G26350A		G26529C				Arg399Gln			
Genotípica	CC	0,80	GG	0,96	GG	1,00	AA	0,50	GG	0,52	CC	0,71
	CT	0,16	GA	0,04	GC	-	AG	0,37	GA	0,38	CT	0,25
	TT	0,04	AA	-	CC	-	GG	0,13	AA	0,10	TT	0,04
Alélica	C	0,87	G	0,98	G	1,00	A	0,69	G	0,70	C	0,83
	T	0,13	A	0,02	C	-	G	0,31	A	0,30	T	0,17

4.3.2.1.3 Alenquer

A distribuição das frequências genotípicas no gene *XRCCI* na população de Alenquer não indicou um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) para a maioria das mutações estudadas no gene *XRCCI*, com exceção do ponto G26529C no íntron 6 ($p = 0,01$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Frequências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo *XRCCI* na população de Alenquer.

Frequências	Éxon 6		Íntron 6				Íntron 9		Éxon 10		Íntron 10	
	Arg194Trp		G26350A		G26529C				Arg399Gln			
Genotípica	CC	0,87	GG	0,94	GG	0,98	AA	0,50	GG	0,50	CC	0,62
	CT	0,13	GA	0,06	GC	-	AG	0,37	GA	0,37	CT	0,30
	TT	-	AA	-	CC	0,02	GG	0,13	AA	0,13	TT	0,08
Alélica	C	0,93	G	0,97	G	0,98	A	0,68	G	0,68	C	0,76
	T	0,07	A	0,03	C	0,02	G	0,32	A	0,32	T	0,24

4.3.2.2 Variabilidade da frequência alélica

Em relação ao gene *XRCC1*, as frequências alélicas de todos os pontos estudados se mostraram estatisticamente semelhantes entre as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer ($p > 0,05$), com exceção da frequência em G26529C no íntron 6 entre Monte Alegre e Prainha (G 0,94/C 0,06; G 1,00/C -, respectivamente; $p = 0,038$).

4.3.3 Gene de reparo *XRCC3*

Após o seqüenciamento direto do gene *XRCC3*, englobando o íntron 6 e o éxon 7, foi possível a identificação de duas mutações: i) A17893G (rs1799796), presente no íntron 6; ii) C18067T (rs861539), presente no éxon 7 e que resulta na troca de aminoácidos de treonina para metionina na posição 241 (*Thr241Met*).

4.3.2.3 Frequências alélicas e genotípicas

4.3.2.3.1 Monte Alegre

A distribuição das frequências genotípicas no gene *XRCC3* na população de Monte Alegre não indicou um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) para todas as mutações estudadas no gene *XRCC3* (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo *XRCC3* na população de Monte Alegre.

<i>Frequências</i>	<i>Íntron 6</i>		<i>Éxon 7</i>	
			<i>Thr241Met</i>	
<i>Genotípica</i>	AA	0,42	CC	0,49
	AG	0,48	CT	0,48
	GG	0,10	TT	0,03
<i>Alélica</i>	A	0,65	C	0,72
	G	0,35	T	0,28

4.3.2.3.2 Prainha

A distribuição das frequências genotípicas no gene *XRCC3* na população de Prainha não indicou um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) para todas as mutações estudadas no gene *XRCC3* (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo *XRCC3* na população de Prainha.

<i>Frequências</i>	<i>Íntron 6</i>		<i>Éxon 7</i>	
			<i>Thr241Met</i>	
<i>Genotípica</i>	AA	0,42	CC	0,75
	AG	0,42	CT	0,25
	GG	0,16	TT	-
<i>Alélica</i>	A	0,63	C	0,87
	G	0,37	T	0,13

4.3.2.3.3 Alenquer

A distribuição das frequências genotípicas no gene *XRCC3* na população de Alenquer não indicou um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) para todas as mutações estudadas no gene *XRCC3* (Tabela 11).

Tabela 11 - Frequências alélicas e genotípicas das mutações no gene de reparo *XRCC3* na população de Alenquer.

<i>Frequências</i>	<i>Íntron 6</i>		<i>Éxon 7</i>	
			<i>Thr241Met</i>	
<i>Genotípica</i>	AA	0,59	CC	0,42
	AG	0,39	CT	0,52
	GG	0,02	TT	0,06
<i>Alélica</i>	A	0,78	C	0,67
	G	0,22	T	0,33

4.3.2.4 Variabilidade das frequências alélicas

Em relação ao íntron 6 do gene *XRCC3*, as frequências alélicas estudadas não diferiram estatisticamente entre as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer, excetuando-se as frequências entre Prainha e Alenquer (A 0,63/G 0,37; A 0,78/G 0,22, respectivamente; $p = 0,030$). Relativamente ao éxon 7 (*Thr241Met*), somente as frequências alélicas da população de Prainha (C 0,87/T 0,13) se mostraram discrepantes em relação a Monte Alegre (C 0,72/T 0,28; $p = 0,014$) e a Alenquer (C 0,67/T 0,33; $p = 0,001$).

4.3.4 Gene *GSTM1*

Através da amplificação do gene de metabolização *GSTM1*, verificou-se a ausência ou presença deste nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer. A tabela 12 apresenta a distribuição das frequências do gene *GSTM1* nas três populações, que se mostraram estatisticamente semelhantes ($p = 0,412$).

Tabela 12 - Frequências do gene de metabolização *GSTM1* nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

<i>Frequências</i>	<i>Monte Alegre</i>	<i>Prainha</i>	<i>Alenquer</i>
<i>Ausência</i>	0,36	0,31	0,40
<i>Presença</i>	0,64	0,69	0,60

4.3.5 Variação Genética

Considerando os genes *XRCC1* e *XRCC3*, a variação genética entre as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer, traduzida como valores de F_{st} (pairwise), indicou que Prainha e Alenquer são menos semelhantes geneticamente ($F_{st} = 0,023$), enquanto que Monte Alegre apresentou uma menor variação genética frente a Prainha ($F_{st} = 0,004$) e a Alenquer ($F_{st} = 0,001$), considerando o nível de significância de $p < 0,05$.

4.3.6 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação foi avaliado par a par entre todos os pontos estudados dos genes *XRCC1* e *XRCC3* com um nível de significância igual a 0,05. As três populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer foram consideradas como uma só. Os dois pontos do *XRCC3* apresentaram desequilíbrio de ligação entre si e equilíbrio de ligação com todos os pontos do *XRCC1*. Os pontos nos éxons 6 (C26304T) e 10 (G28152A) e os pontos nos íntrons 9 (G27980A) e 10 (C28234T) do gene *XRCC1* somente apresentaram desequilíbrio de ligação entre si. Em relação aos pontos no íntron 6 (G26350A e G26529C) deste mesmo gene, estes se apresentaram em equilíbrio de ligação com todos os pontos restantes do gene.

4.3.3 Associação entre genótipos dos genes *XRCC1*, *XRCC3* e *GSTM1* e os índices de dano ao DNA em linfócitos periféricos

4.3.3.1 *XRCC1* e *XRCC3*

Não houve indicativo de correlação entre as mutações nos genes *XRCC1* e *XRCC3* e a extensão de dano ao DNA das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer. Em relação ao alelo *399Gln* do *XRCC1*, a análise comparativa entre os genótipos *399Arg/Arg* versus *399Arg/Gln* e *Gln/Gln* resultou no seguinte valor de risco relativo $RR = 1,15$ ($p = 0,768$), enquanto que, para os íntrons 9 e 10, a ausência de associação se traduziu nos valores $RR = 1,08$; $p = 897$ e $RR = 0,90$; $p = 0,837$, respectivamente. Semelhantemente, a análise do alelo *241Met* do *XRCC3* não indicou relação com os índices do biomarcador de genotoxicidade (*241Thr/Thr* x *Thr/Met* e *Met/Met*: $RR = 0,78$; $p = 0,622$), assim como para o íntron 6 do gene *XRCC3*, em que foram obtidos os seguintes valores: $RR = 0,58$ ($p = 0,334$).

4.3.3.2 *GSTM1*

Os dados de presença e ausência do gene *GSTM1* foram utilizados como fator independente na análise de regressão logística em relação ao nível de dano ao DNA de linfócitos de indivíduos residentes nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer. Não foi observada relação entre a prevalência desse polimorfismo e a extensão de dano ao DNA, configurando valores de $RR = 1,33$ e $p = 0,590$.

5 DISCUSSÃO

Levantamentos radiométricos e caracterizações geológicas realizadas nas regiões de estudo revelaram ocorrências de urânio nas rochas a 20 Km da cidade de Monte Alegre, decorrentes de afloramentos minerais ocorridos no passado. Na década de 80, residências e calçadas foram construídas pela população de Monte Alegre utilizando blocos de pedra contendo urânio, mais especificamente na comunidade de Inglês de Souza, o que alertou para a importância do monitoramento dessa população (MELO, 1999).

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 metabólicos adversos, nefrotoxicidade, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, além de conseqüências mutagênicas e carcinogênicas através da exposição e contaminação pelo urânio (DURAKOVIAE, 1999).

Estudos anteriores indicaram a possível associação entre casos de leucemia linfocítica aguda e exposição à radiação gama em indivíduos com menos de 20 anos de idade na Suécia. As pessoas afetadas residiam em casas construídas com concreto contendo urânio, o que sugere o risco de desenvolvimento de neoplasias em crianças e jovens adultos expostos a radiação (AXELSON *et al.*, 2002). Um número maior de casos dessa doença também foi verificado em crianças e adolescentes expostas a água com concentrações aumentadas de arsênio, radônio e urânio, além de radiatividade por partículas alfa (SEILER, 2004).

Uma pesquisa realizada por Melo (1999) englobando análises de amostras de rocha e de solo no município de Monte Alegre, incluindo a região de Inglês de Souza, determinou que as concentrações de ^{238}U e os fluxos de radônio no solo dessa região são superiores em 17 vezes comparativamente aos níveis da zona urbana de Monte Alegre. A Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) recomenda que o nível de ação remediadora (nível de ação¹) para o radônio em residências deve ser selecionado dentro da faixa de 3 a 10 mSv de dose anual efetiva, equivalendo a concentrações de 200 e 600 Bq.m⁻³, respectivamente (ICRP, 1994; WRIXON, 2008). Considerando, entretanto, os valores de dose referidos pela ICRP, a concentração de radônio nas residências não ultrapassou os limites recomendados, além de que a medida da dose efetiva de radiação gama no solo da região de Inglês de Souza foi de apenas 1,7 vezes superior a cidade de Monte Alegre (MELO, 1999).

¹ Nível de dose ou concentração acima da qual ações remediadoras ou protetoras são tomadas porque se espera que a dose prevenida pela ação proposta irá exceder o nível de intervenção² (ICRP, 1997).

Esses resultados indicam a importância, além das medidas de concentração de radionuclídeos naturais, da análise do possível efeito genotóxico do urânio nas populações da região, assim como uma abordagem genética de polimorfismos em relação a danos ao DNA não reparados que possam ser acumulados pela exposição à radiação em baixa dose.

No presente trabalho, os Índices de Dano ao DNA (IDs) observados para as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer não diferiram estatisticamente dos IDs do controle negativo ($p > 0,05$). Esse resultado obtido através do ensaio do cometa alcalino como um biomarcador de exposição corrobora com resultados também negativos em testes de biomarcação de efeitos biológicos precoces realizados nessas mesmas populações como parte do projeto de pesquisa ao qual este trabalho pertence (BRITO, 2008; JATI, 2008). Brito (2008) e Jati (2008) evidenciaram que as frequências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos, observadas nos indivíduos do grupo controle, não foram estatisticamente diferentes das frequências observadas na população de Monte Alegre, Prainha e Alenquer ($p > 0,01$), em nível de significância estabelecido em 1%. Os dois testes são usados com confiança na detecção de exposição à radiação ionizante e na previsão de incidência de câncer (BONASSI; AU, 2002).

Esses resultados induzem a duas suposições que podem ser formuladas sobre a emissão do urânio presente na região geográfica onde a população de Monte Alegre está localizada: esta não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA e/ou para interferir na montagem das fibras do fuso; ou os danos causados pela radiação emitida são suscetíveis de reparo pela célula.

Quando se objetiva reduzir os níveis de radônio nas residências, a ICRP 65 sugere que o nível de intervenção² para o radônio em residências só se justificará com concentrações superiores a 600 Bq.m^{-3} ou doses anuais de 10 mSv (ICRP, 1994; WRIXON, 2008). A radiação emitida no interior das residências construídas com rochas uraníferas em Monte Alegre apresentou uma média de $116 \pm 84 \text{ Bq.m}^{-3}$ (MELO, 1999), o que representa menos de um terço do valor mínimo recomendado para intervenção radiológica, além de não alcançar o valor mínimo recomendado pela ICRP 65 para o nível de ação (200 Bq.m^{-3}). Desse modo, do ponto de vista da proteção radiológica, os valores medidos em Monte Alegre não representariam riscos à saúde da população. Os resultados de genotoxicidade corroboram com os limites estabelecidos pela ICRP.

² Nível de dose em que ações específicas de proteção ou remediadoras são tomadas em situações de emergência ou exposição crônica (ICRP, 1997).

Como grande parte do depósito uranífero na região de estudo é formada por urânio em baixos teores, é provável que somente alta emissão de urânio seja suficiente para induzir lesões no DNA. Através do ensaio do cometa, verificou-se que a inalação de partículas de urânio empobrecido somente induziu um efeito genotóxico em células bronco-alveolares de ratos em concentrações altas (MONLEAU *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou, através do ensaio do cometa, um aumento de lesões ao DNA proporcional ao aumento da concentração de urânio após a exposição de células NRK – 52^E a concentrações sub-letais e letais de urânio (THIÉBAULT *et al.*, 2007).

Em relação à ausência de dano em doses mais baixas, Gochfeld (1997) hipotetizou que os níveis de antioxidantes endógenos podem alterar a susceptibilidade a alguns efeitos tóxicos de metais. Além disso, um limiar para a genotoxicidade *in vivo* é freqüentemente uma consequência de um adequado status de reparo do DNA e/ou de antioxidantes intrínsecos, além de outros fatores (KIRSCH-VOLDERS; AARDEMA; ELHAJOUJI, 2000).

Os índices de dano na molécula do DNA obtidos para as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer não diferenciaram do grupo controle negativo. Entretanto, o índice de dano de Monte Alegre se apresentou estatisticamente menor que as outras duas populações ($p < 0,001$). Pode-se supor que a radiação do urânio em baixa dose esteja estimulando a produção de enzimas de reparo do DNA, fenômeno conhecido como resposta adaptativa, em que o corpo se adapta aos efeitos da radiação através do desenvolvimento de respostas protetoras (COHEN, 2002). Neste estudo, não foram incluídos os voluntários fumantes, visto que a sensibilidade do ensaio cometa é alta e o hábito de fumar é considerado um fator de confusão (FAUST *et al.*, 2004; MØLLER *et al.*, 2000).

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).

Miller *et al.* (2005) desenvolveram um modelo de leucemogênese *in vivo* em camundongos implantados com *pellets* de urânio empobrecido que receberam células hematopoiéticas murinas (FDC-P1). Foi constatado que animais que receberam implantes

celulares com baixas concentrações de urânio empobrecido não apresentaram um incremento no desenvolvimento de leucemias, contrariamente aos animais que receberam alta dose (desenvolvimento de leucemias em 76% dos camundongos). O aumento concentração-dependente na frequência de transformação morfológica de células osteoblásticas humanas imortalizadas (HOS) para um fenótipo tumorigênico pelo urânio empobrecido já havia sido demonstrado por esse mesmo grupo de pesquisadores (MILLER *et al.*, 1998). Provavelmente a carcinogênese encontrada na região de estudo está relacionada a indivíduos que apresentam susceptibilidade genética à radiação ou predisposição familiar ao desenvolvimento do câncer, embora a taxa de mortalidade por câncer em Monte Alegre não seja maior que o padrão da região norte do Brasil no Estado do Pará, onde as populações de estudo estão localizadas (SBPC, 2003).

Entre os traços genéticos capazes de modificar os níveis individuais de dano ao DNA, variações genéticas no metabolismo de xenobióticos e no reparo do DNA desempenham um papel central, em que diversos SNPs são estudados em vários genes envolvidos na ativação/detoxificação de compostos genotóxicos e no subsequente reparo de danos induzidos no DNA (ZIJNO *et al.*, 2006). Essas variações no reparo do DNA são um fator bem estabelecido no grau de susceptibilidade à radiação ionizante. A exposição a compostos metálicos clastogênicos como o urânio, pode, portanto, ser influenciada pela eficiência do reparo do DNA, em que o reparo não-eficiente de danos pode levar a um crescimento desregulado celular e câncer (CHANVAIVIT *et al.*, 2007; GOCHFELD, 1997).

No presente estudo, as frequências alélicas para o polimorfismo *194Trp* no gene *XRCC1* nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer encontradas foram 12%, 13% e 7%, respectivamente, e se mostraram estatisticamente semelhantes. Essas frequências encontradas do alelo variante *194Trp* se aproximam de outros dois resultados para a população brasileira, que indicaram frequências de 7% e 8,2% (DUARTE *et al.*, 2005; ROSSIT *et al.*, 2002). A frequência de alelos polimórficos varia entre as populações, sugerindo uma distribuição étnica. A compilação de diversas análises indica que o alelo *194Trp* se encontra em altas frequências em populações asiáticas, podendo alcançar 34,8% em chineses e em baixas frequências entre caucasianos e africanos, chegando a 2,7% na Finlândia (HU *et al.*, 2005; MOHAMADYNEJAD; SAADAT, 2008).

A presença do alelo variante *194Trp* é indicativa de aumento da frequência de aberrações cromossômicas tanto *in vitro*, em resposta à exposição a raios-X (AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003) como *in vivo*, em indivíduos expostos ocupacionalmente a radiações ionizantes (WANG *et al.*, 2006). As frequências dos genótipos variantes em *194Trp*

apresentam valores de 23% e 20% em Monte Alegre e Prainha, respectivamente, enquanto que, em Alenquer, a frequência é menor, com valor em torno de 13%.

Em relação ao polimorfismo *399Gln* no gene *XRCC1*, as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer apresentaram frequências do alelo variante estatisticamente semelhantes com valores de 28%, 30% e 32%, respectivamente. Duarte *et al.* (2005) também obtiveram a frequência do polimorfismo *399Gln*, em uma população no sudeste brasileiro, em 33%, enquanto que Rossit *et al.* (2002) verificaram a presença desse alelo em 37,1% em uma população da mesma região. Em um estudo desse polimorfismo no gene *XRCC1* na China, a frequência do alelo variante ficou em torno também de 28% (SHU *et al.*, 2003). No geral, a frequência do alelo *399Gln* é de aproximadamente 35% entre os europeus, 26% entre os asiáticos e 13% em populações africanas (HU *et al.*, 2005). Os dados encontrados de frequência alélica do *399Gln* no presente estudo supõem uma semelhança maior entre as populações estudadas e populações caucasianas.

Diversos estudos já indicaram uma capacidade reduzida de reparo do DNA em indivíduos que carregam o alelo variante *399Gln*. Os genótipos *Arg399Gln* ou *Gln/Gln* se mostraram associados a um aumento da frequência de deleções e de cromossomos dicêntricos induzidos por radiação gama em relação ao genótipo homocigoto selvagem *Arg399Arg* (CHANVAIVIT *et al.*, 2007). Resultado parecido foi o encontrado por Au, Salama e Sierra-Torres (2003), em que linfócitos irradiados com raios-X apresentaram uma incidência maior de células aberrantes e deleções cromossômicas em indivíduos com o genótipo *399Gln*, tanto homocigoto como heterocigoto, em comparação com o genótipo *Arg399Arg*. As frequências de indivíduos carregando esses genótipos suscetíveis à radiação nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer são altas, abrangendo 47%, 48% e 50%, respectivamente, o que torna necessário medidas de proteção a um acúmulo de danos ao DNA em indivíduos mais suscetíveis à radiação do urânio.

Além disso, foi constatada uma associação entre a presença do alelo variante *399Gln* no gene *XRCC1* e os genótipos variantes *Thr241Met* ou *Met/Met* no gene *XRCC3* com um aumento significativo de deleções cromossômicas em linfócitos irradiados por raios-X (AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003). Dentre os indivíduos participantes desse estudo com genótipos de presença do alelo *399Gln* no gene *XRCC1* (72 voluntários), aproximadamente a metade (47,2%) também possui o alelo variante *241Met* no gene *XRCC3*.

Considerando os indivíduos mais susceptíveis à radiação do urânio, que carregam os alelos variantes, alguns cuidados devem ser tomados em relação a outras formas de exposição a agentes carcinogênicos, como a radiação ultravioleta presente nos raios solares. A

exposição excessiva ao sol é o principal fator de risco ao câncer de pele. O tipo não-melanoma é o mais freqüente, abrangendo 95% dos diagnósticos de câncer de pele. Desse modo, indivíduos que trabalham com exposição direta ao sol são os mais vulneráveis ao câncer de pele não-melanoma (INCA, 2008). O genótipo homozigoto variante *399Gln/Gln* do gene *XRCCI*, considerando um histórico de queimaduras dolorosas de pele, é considerado um fator de risco ao câncer de pele não-melanoma, apresentando um risco aumentado em quase 7 vezes para esses indivíduos (NELSON *et al.*, 2002). O presente estudo verificou uma exposição ocupacional ao sol maior em mais de duas vezes pela população de Monte Alegre em comparação às duas outras, mas não analisou o histórico de possíveis queimaduras resultantes da exposição. Além disso, entre os quatro relatos de câncer no histórico de saúde dos indivíduos participantes do estudo, um foi de câncer de pele em Monte Alegre, entretanto, o tipo do câncer não foi especificado. Entre os indivíduos, em Monte Alegre, carregando esse genótipo de reparo do DNA menos eficiente (presente em 9% da população), o acúmulo de danos por exposição excessiva ao sol, e até mesmo de danos normalmente reparáveis resultantes da exposição ao urânio em baixas doses, poderá ser maior em relação aos outros indivíduos. O genótipo em questão poderia configurar como um fator de risco entre os trabalhadores expostos ao sol excessivamente.

Vodicka *et al.* (2004) também relataram uma associação entre a taxa de reparo de danos no DNA resultantes da exposição à radiação gama e o polimorfismo no gene *XRCCI Arg399Gln*, em que o reparo desses danos se apresentou 2 vezes maior para os indivíduos com genótipos selvagens homozigotos comparativamente ao genótipo variante homozigoto. Esse resultado se mostra importante em relação ao presente trabalho em vista das moderadas freqüências genotípicas evidenciadas do genótipo homozigoto variante nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer (0,09; 0,10 e 0,13, respectivamente) – média aproximada de 11% dos indivíduos – e o fato de que estas se encontram expostas a radiação do urânio. Nesse caso, esses indivíduos apresentariam, em parte, um reparo dos danos menos eficiente, tornando-os mais susceptíveis à exposição ao urânio.

Apesar de SNPs em regiões intrônicas dificilmente apresentarem um papel funcional direto, estes podem afetar o *splicing* do RNA e, conseqüentemente, a transcrição de um gene (PAGANI & BARALLE, 2004). Em relação ao gene *XRCCI*, não foram encontrados estudos relacionando os SNPs em regiões intrônicas ao risco de câncer. Adicionalmente, a mutação G26529C (ítron 6) não foi encontrada no banco de dados de SNPs da NCBI. O alelo variante C se mostrou pouco freqüente nas três populações,

apresentando freqüências alélicas de 6% e 2% em Monte Alegre e Alenquer, respectivamente, e ausente em Prainha.

As freqüências do alelo variante *241Met* no gene de reparo de DNA *XRCC3* encontradas nas populações de Monte Alegre e Alenquer (0,28 e 0,33, respectivamente) mostraram-se em concordância com freqüências obtidas em diversos trabalhos compilados por Han *et al.* (2006), que consideraram a freqüência média desse alelo no grupo europeu em torno de 36,1%. Duarte *et al.* (2005) também encontraram a freqüência desse alelo em torno de 35% em uma avaliação de indivíduos saudáveis no sudeste do Brasil. Para a população de Prainha, cuja freqüência encontrada foi de 13%, o resultado assemelha-se às freqüências menores desse alelo na população asiática (em torno de 8,22%) (HAN *et al.*, 2006). Essas diferenças nas freqüências alélicas entre grupos podem surgir ao acaso e pressões de seleção podem existir, mantendo as freqüências alélicas mais baixas, como proposto por Han *et al.* (2006) em relação aos asiáticos.

Vários trabalhos indicam que a proteína *XRCC3* com a presença do aminoácido metionina na posição 241 é defectiva no sistema de reparo em que se insere. Foi verificado que os genótipos variantes *241Thr/Met* e *Met/Met* estão associados a um significativo aumento de deleções cromossômicas em linfócitos expostos a raios-X (AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003). Esses genótipos se encontram distribuídos em 51% dos indivíduos da população de Monte Alegre, 58% de Alenquer e, menos freqüentemente em Prainha, abrangendo 25% dos moradores dessa localidade.

Fatores ambientais, como o tabaco e a radiação ionizante, quando investigados juntamente com os polimorfismos em genes de reparo, podem melhor indicar riscos relacionados ao fenótipo do indivíduo resultante da presença desses polimorfismos. Uma análise combinada de estudos que consideraram o histórico de fumo dos participantes indica que o risco ao câncer associado ao genótipo variante *241Met/Met* no *XRCC3* é maior entre fumantes do que entre não-fumantes (HAN *et al.*, 2006). Essa correlação é importante na medida em que o genótipo homozigoto variante *241Met/Met* está presente em Monte Alegre e Alenquer nas freqüências de apenas 0,03 e 0,06, respectivamente, mas ausente em Prainha. Além disso, os grupos de não-fumantes abrangem mais da metade daquelas duas populações, correspondendo a 64% e 70%, respectivamente. Portanto, o risco da associação desse genótipo com o hábito de fumo se mostra bastante reduzido dentre os indivíduos das três populações.

Em relação à região intrônica estudada do gene *XRCC3*, alguns trabalhos avaliaram a associação dessa variação do nucleotídeo 17893 de A para G no íntron 6 com o

risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Um resultado anterior foi obtido pelo estudo de Jiao *et al.* (2008), que não indicou nenhuma evidência de associação entre esse SNP e o risco de câncer pancreático. Outro trabalho mostrou que os portadores do alelo variante G, tanto homozigotos como heterozigotos, apresentaram menor risco significativo ao desenvolvimento do câncer de mama quando comparados com os portadores do alelo A homozigotos, ambos com valores de $RR = 0,80$ (KUSCHEL *et al.*, 2002).

As freqüências do alelo variante G estudado no gene *XRCC3* no íntron 6 em Monte Alegre e Prainha (0,35 e 0,37, respectivamente) se assemelham com as freqüências obtidas em outros trabalhos: 0,30 (JIAO *et al.*, 2008), 0,30 a 0,34 (KUSCHEL *et al.*, 2002) e 0,36 (JACOBSEN *et al.*, 2004). Esse polimorfismo se mostrou menos freqüente na população de Alenquer, onde a freqüência do alelo variante está em torno de 22% dos indivíduos.

Em relação ao gene *GSTM1*, as freqüências obtidas de ausência do gene para as populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram os valores de 36%, 31% e 40%, respectivamente. Essas freqüências se apresentaram semelhantes a valores de outros estudos envolvendo populações das regiões sul e sudeste do Brasil, que indicaram freqüências de deleção do gene *GSTM1* de 33% e 34,6%, respectivamente (DUARTE *et al.*, 2006; GRANDO *et al.*, 2009).

Efeitos genotóxicos após a exposição a carcinógenos podem ser influenciados por características individuais herdadas e adquiridas que contribuem na determinação do risco ao câncer (GODDERIS *et al.*, 2006). Indivíduos fumantes expostos ao cobalto e a outros metais pesados, por exemplo, que possuem genótipo variante no alelo *241Met* do *XRCC3* apresentam um risco maior para a quebra do DNA (MATEUCA *et al.*, 2005). Os níveis de formação de micronúcleos e dano ao DNA também foram superiores em células que possuíam o alelo *241Met* expostas a óxido de etileno, um composto alquilante e indutor de quebras de fitas de DNA (GODDERIS *et al.*, 2006).

Considerando que a radiação do urânio apresenta o efeito indutor de quebras de fita de DNA, foi realizada a análise da correlação da presença dos diversos polimorfismos estudados nos genes *XRCC1*, *XRCC3* e *GSTM1* do presente trabalho na susceptibilidade genotóxica dos indivíduos expostos ao urânio residentes nas populações em estudo. Não se observou uma associação entre esses polimorfismos e os índices de dano ao DNA. Esse resultado não invalida a contribuição dos genótipos polimórficos na variabilidade inter-individual e na susceptibilidade ao câncer em vista da baixa radiação de urânio presente na região. Isso porque a influência de polimorfismos genéticos de enzimas envolvidas na biotransformação e reparo do DNA na genotoxicidade induzida por radiação depende da dose

de exposição, portanto, a influência no dano ao DNA visualizado pelo teste do cometa é mais pronunciada em doses mais altas (GODDERIS *et al.*, 2006).

Apesar de as frequências alélicas dos polimorfismos nos genes *XRCC1* e *XRCC3* nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer, assim como as frequências da ausência do gene *GSTM1*, não diferirem das de outras regiões do Brasil, essas populações, principalmente os indivíduos mais susceptíveis à radiação, devem adotar hábitos saudáveis. Através de diversos estudos, foi evidenciada uma associação inversa entre o risco ao câncer e o consumo de vegetais e frutas, demonstrada em casos de câncer de esôfago, pulmão, estômago, cólon, reto e boca e faringe. Além da presença de antioxidantes, como carotenóides e vitamina C, esses alimentos apresentam outras moléculas com atividade quimiopreventiva ao desenvolvimento de câncer. Compostos organo-sulfúricos, isotiocianatos e terpenos, por exemplo, apresentam atividades quimiopreventivas pela indução da atividade de enzimas de fase II, como as glutathione S-transferases, além de outras ações (GREENWALD; CLIFFORD; MILNER, 2001). Dentre todos os conhecidos, os isotiocianatos estão entre os agentes quimiopreventivos mais efetivos, inibindo enzimas de fase I responsáveis pela bioativação de carcinógenos. O consumo aumentado de isotiocianatos presentes em vegetais verdes crucíferos, como brócolis e repolho, significou uma redução em 70% e 30% do risco de câncer de pulmão em fumantes e não-fumantes, respectivamente (ZHAO *et al.*, 2001). O consumo de vegetais e frutas, por suas propriedades quimiopreventivas ao desenvolvimento do câncer, se mostra então relevantemente indicado para as populações estudadas como um fator de proteção à baixa radiação a que são expostas, considerando ainda o radônio no interior das casas como um fator importante na indução de câncer de pulmão.

Além disso, o consumo de isotiocianatos por indivíduos *GSTM1*-nulos é um fator de proteção ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, como o de pulmão, mama e adenocarcinoma de cólon (BRENNAN *et al.*, 2005). Na ausência do gene *GSTM1*, o fato de nunca ter fumado na vida se mostra como um elemento protetor, em que um consumo maior daqueles legumes indicou um risco ao câncer de pulmão reduzido em 50% (ZHAO *et al.*, 2001). Considerando que 64% da população de Monte Alegre é formada por pessoas que nunca fumaram, o consumo de alimentos ricos em isotiocianatos e em outras moléculas quimiopreventivas se mostra importante na prevenção da carcinogênese, principalmente para os indivíduos *GSTM1*-nulos, que perfazem 36% dessa população.

Independentemente, o conjunto de marcadores genéticos alterados presentes nas populações investigadas da região é de grande relevância no desenvolvimento de muitas enfermidades, entre as quais o câncer. Dessa forma, medidas preventivas no âmbito da saúde

pública municipal devem ser realizadas para que ocorra a diminuição do número de doenças que possam estar relacionadas com a presença destes marcadores.

6 CONCLUSÃO

Dentre as populações estudadas de Monte Alegre, Prainha e Alenquer, não houve aumento da incidência de dano ao DNA em vista da exposição ao urânio, o que deve refletir as baixas doses de radiação a que são expostas. Além disso, as frequências alélicas dos polimorfismos encontrados nos genes de reparo de DNA *XRCC1* e *XRCC3*, assim como as frequências da ausência do gene de metabolização *GSTM1*, não diferiram das encontradas em populações de outras regiões do Brasil. Desse modo, nas regiões estudadas, possivelmente não existe tendência ao desenvolvimento de câncer induzido pela exposição ao urânio.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z. *et al.* (2000) Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene *XRCC1* are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. **Cancer Letters**, v. 159, n. 1, p. 79-86.

AITKEN, M. (1999) Gulf War leaves legacy of cancer. **British Medical Journal**, v. 319, p. 401.

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

ALLEN, N. *et al.* The causes of cancer. In: KNOWLES, M. A. & SELBY, P. J. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**. 4 ed. New York: Oxford University Press, 2005.

AMUNDSON, S. A. *et al.* (2001) Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 1, n. 2, p. 89 – 97.

ANDREW, A. S. *et al.* (2008) DNA repair polymorphisms modify bladder cancer risk: a multi-factor analytic strategy. **Human Heredity**, v. 65, n. 2, p. 105-118.

AU, W. W. *et al.* (1996) Monitoring populations for DNA repair deficiency and for cancer susceptibility. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 3, p. 579-584.

AU, W. W.; SALAMA, S. A.; SIERRA-TORRES, C. H. (2003) Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 15, p. 1843 – 1850.

AXELSON, O. *et al.* (2002) Leukemia in Childhood and Adolescence and Exposure to Ionizing Radiation in Homes Built from Uranium-Containing Alum Shale Concrete. **Epidemiology**, v. 13, n. 2, p. 146 – 150.

BATAR, B. *et al.* (2009) DNA repair gene *XPD* and *XRCC1* polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, v. 33, n. 6, p. 759-763.

BAUTE, J.; DEPICKER, A. (2008) Base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 239–276.

BELL, D. A. *et al.* (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) that increases susceptibility to bladder cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, p. 1159-1164.

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

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

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

BRENNAN, P. *et al.* (2005) Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomization approach. **The Lancet**, v. 366, p. 1558 – 1560.

BRITO, A. W. M. **Avaliação de indução de micronúcleos como indicador dos possíveis efeitos genotóxicos do urânio em residentes do município de Monte Alegre**. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

BURNHAM, J. W.; FRANCO, J. (2005) Radiation. **Critical Care Clinics**, v. 21, p. 785–813.

CALDECOTT, K. W. (2003) XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair**, v. 2, p. 955–969.

CANU, I. G.; ELLIS, E. D.; TIRMARCHE, M. (2008) Cancer risk in nuclear workers occupationally exposed to uranium-emphasis on internal exposure. **The Radiation Safety Journal**, v. 94, n. 1, p. 1-17.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. (1988) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPENC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, v. 204, p. 379-406.

CELKAN, T. *et al.* (2008) The difference between pre-B cell acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma in relation to DNA damage repair gene polymorphisms in childhood. **Leukemia & Lymphoma**, v. 49, p. 1638–1640.

CHANVAIVIT, S. *et al.* (2007) Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. **Mutation Research**, v. 626, p. 79–87.

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

CHEN, Y. *et al.* (2006) Association of Polymorphisms in *AhR*, *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* Genes with Levels of DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes among Coke-Oven Workers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, n. 9, p. 1703-1707.

COCKERHAM, C. C.; WEIR, B. S. (1993) Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v. 47, p. 855-863.

COHEN, B. L. (2002) Cancer risk from low-level radiation. **American Journal of Roentgenology**, v. 179, p. 1137 – 1143.

COLLINS, A. R. (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, p. 139-146.

_____. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-246.

COLLINS, A. R.; MA, A. G. ; DUTHIE, S. J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77.

CPRM. COMPANHIA DE PESQUISA DE RECURSOS MINERAIS (1998). **Diagnóstico dos resíduos sólidos, Cidade de monte alegre**. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/diag_resid_solido.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2008.

COTTON, S. C. *et al.* (2000) Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Colorectal Cancer: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, n. 1, p. 7-31.

CRAFT, E. S. *et al.* (2004) Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 7, p. 297–317.

DOMINGO, J. L. (2001) Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: A review. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 603–609.

DUARTE, E. C. B. *et al.* (2006) *GSTM1* polymorphism and oral leukoplakia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 35, p. 202–205.

DUARTE, M. C. *et al.* (2005) Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, 397- 401.

DU FOUR, V. A. *et al.* (2005) Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. **Mutation Research**, v. 588, n. 2, p. 106-117.

DURAKOVIAE A. (1999) Medical effects of internal contamination with uranium. **Croatian Medical Journal**, v. 40, n. 1, p 49-66.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. (1995) Maximum likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 921-927.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491.

FAUST, F. *et al.* (2004) The use of alkaline assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 566, p. 209-229.

FINCH, S. C. (2007) Radiation-induced leukemia: Lessons from history. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 20, n. 1, p. 109 - 118.

FRENCH, D. *et al.* (2005) Global gene expression as a function of germline genetic variation. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 12, p. 1621-1629.

FUCIC, A. *et al.* (2008) Genomic damage in children accidentally exposed to ionizing radiation: A review of the literature. **Mutation Research**, v. 658, p. 111–123.

GAO Y.; ZHANG, Q. (1999) Polymorphisms of the *GSTM1* and *CYP2D6* genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. **Mutation Research**, v. 444, p. 441–449.

GATTÁS, G. J. *et al.* (2006) Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1* associated with head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 28, n. 9, p.819-26.

GATTÁS, G. J. F.; SEGRE, M.; WÜNSCH FILHO, V. (2002) Genetics, molecular biology and ethics: work and health connections. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n.1, p. 159-167.

van GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; KANAAR, R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nature Reviews. Genetics**, v. 2, n. 3, p. 196-206.

GOCHFELD, M. (1997) Factors Influencing Susceptibility to Metals. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 4, p. 817-822.

GODDERIS, L. *et al.* (2006) Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation. **Toxicology**, v. 219, p. 220–229.

GODSCHALK, R. W. *et al.* (2001) Modulation of DNA and protein adducts in smokers by genetic polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT1* and *NAT2*. **Pharmacogenetics**, v. 11, n. 5, p. 389-98.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. (2002) Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 1513–1530.

GRANDO, J. P. S. *et al.* (2009) Association between polymorphisms in the biometabolism genes *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* in bladder cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 1, p. 21-28.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C. K.; MILNER, J. A. (2001) Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 948–965.

GRIFFIN, C. S. *et al.* (2000) Mammalian recombination-repair genes *XRCC2* and *XRCC3* promote correct chromosome segregation. **Nature. Cell Biology**, v. 2, p. 757–761.

GRONAU, S. *et al.* (2000) *GSTM1* gene polymorphism in patients with head and neck tumors. **Laryngorhinootologie**, v. 79, n. 6, p. 341-344.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361 – 372.

HAHN, F. F.; GUILMETTE, R. A.; HOOVER, M. D. (2002) Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 1, p. 51–59.

HAN, S. *et al.* (2006) DNA repair gene *XRCC3* polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, 1136–1144.

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

HIRATA, H. *et al.* (2006) Polymorphisms of DNA repair genes are associated with renal cell carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 1058–1062.

HORE-LACY, I. (2008) Uranium. In: **Encyclopedia of Earth**, Washington, D.C. Disponível em: <<http://www.eoearth.org/article/Uranium>>. Acesso em: 24 nov. 2008.

HORTON, J. K. *et al.* (2008) *XRCC1* and DNA polymerase β in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. **Cell Research**, v. 18, n.1, p. 48–63.

HU, Z. *et al.* (2005) *XRCC1* Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-analysis of 38 Case-Control Studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 7, p. 1819 – 1818.

HUBER P. C.; ALMEIDA W. P. (2008) Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179.

HUNG, R. J. *et al.* (2005) Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 162, n. 10, p. 925-942.

IBGE, 2008a. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/mapas/>>. Acesso em: 13 nov. 2008.

IBGE, 2008b. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008/POP2008_DOU.pdf>.

Acesso em: 13 dez. 2008.

IBGE, 2008c. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>>. Acesso em: 13 nov. 2008.

ICRP (1994) Protection against radon-222 at home and at work. ICRP Publication 65. **Annals of the ICRP**, v. 23, n. 2.

_____. (1997) General principles for the radiation protection of workers. ICRP Publication 75. **Annals of the ICRP**, v. 27, n. 1.

IIDA, A. *et al.* (2001) Catalog of 434 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of the alcohol dehydrogenase, glutathione S-transferase, and nicotinamide adenine dinucleotide, reduced (NADH) ubiquinone oxidoreductase families. **Journal of Human Genetics**, v. 46, p. 385–407.

INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=334>. Acesso em: 5 dez. 2008.

JACOBSEN, N. R. *et al.* (2004) *XRCC3* polymorphisms and risk of lung cancer. **Cancer Letters**, v. 213, p. 67–72.

JATI, S. R. **Avaliação de aberrações cromossômicas como indicador dos possíveis efeitos genotóxicos do urânio em residentes do município de Monte Alegre**. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

JIAO, L. *et al.* (2006) Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 30, p. 284–291.

_____. (2008) *XRCC2* and *XRCC3* gene polymorphism and risk of pancreatic cancer. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 103, n. 2, p. 360–367.

KATZUNG, B. G. Biotransformação. In: _____. **Farmacologia: Básica e Clínica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KELSEY, K. T. *et al.* (2004) A Population-Based Case-Control Study of the *XRCC1 Arg399Gln* Polymorphism and Susceptibility to Bladder Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 8, p. 1337-1341.

KIM, I. G.; LEE, Y. S. (2003) Radiation-induced Tumorigenesis. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 144-148.

KIRSCH-VOLDERS, M.; AARDEMA, M.; ELHAJOUJI, A. (2000) Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 464, p. 3–11.

KNOBEL, Y. *et al.* (2006) Uranyl nitrilotriacetate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon cells and in the human colon adenoma cell line LT97. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 93, p. 286–297.

KNUDSEN, L. E. *et al.* (2005) Genotoxic damage in mine workers exposed to diesel exhaust, and the effects of glutathione transferase genotypes. **Mutation Research**, v. 583, 120–132.

KURUMIZAKA, H. *et al.* (2003) Region and amino acid residues required for Rad51C binding in the human XRCC3 protein. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 14, p. 4041-4050.

KUSCHEL, B. *et al.* (2002) Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 12, p. 1399–1407.

LÓPEZ-CIMA, M. F. *et al.* (2007) Polymorphisms in *XPC*, *XPD*, *XRCC1*, and *XRCC3* DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. **BMC Cancer**, v. 7, n. 162, p. 1-12.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. (2000) Low paraoxonase in Persian Gulf War veterans self-reporting Gulf War syndrome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 2, p. 729–733.

MALUF, S. W. (2004) Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis–block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis **Clinica Chimica Acta**, v. 347, p. 15–24.

MARCON, F. *et al.* (2003) Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. **Mutation Research**, v. 541, p. 1–8.

MATEUCA, R. *et al.* (2005) Influence of *hOGG1*, *XRCC1* and *XRCC3* genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. **Toxicology Letters**, v. 156, p. 277–288.

McDIARMID, M. A. (2001) Depleted uranium and public health. **British Medical Journal**, v. 322, p. 123-124.

MELO, V. P. **Avaliação da concentração do ^{222}Rn nos ambientes internos e externos em residências do município de Monte Alegre, PA.** 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências, modalidade Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Belém, 1999.

MILACIC, S. *et al.* (2004) Examination of the health status of populations from depleted-uranium-contaminated regions. **Environmental Research**, v. 95, p. 2–10.

MILLER M. C.; MOHRENWEISER, H. W.; BELL, D. A. (2001) Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology Letters**, v. 120, p. 269–280.

MILLER, A. C. *et al.* (1998) Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium–uranyl chloride. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 8, p. 465–471.

_____. (2003) Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 64, n. 2–3, p. 247–259.

_____. (2005) Radiation- and depleted uranium – induced carcinogenesis studies: characterization of the carcinogenic process and development of medical countermeasures. **NATO Research Task Group - 099**, p. 1-12.

MILLIKAN, R. C. *et al.* (2005) Polymorphisms in DNA repair genes, medical exposure to ionizing radiation, and breast cancer risk. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 14, n. 10, p. 2326 – 2334.

MOHAMADYNEJAD, P.; SAADAT, M. (2008) Genetic polymorphisms of *XRCC1* (at codons 194 and 399) in Shiraz population (Fars province, southern Iran). **Molecular Biology Reports**, v. 35, n. 4, p. 669-672.

MOHRENWEISER, H. W.; WILSON, D. M.; JONES, I. M. (2003) Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. **Mutation Research**, v. 526, p. 93–125.

MØLLER, P. *et al.* (2000) The Comet Assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 1005–1015.

MONLEAU, M. *et al.* (2006) Genotoxic and Inflammatory Effects of Depleted Uranium Particles Inhaled by Rats. **Toxicological Sciences**, v. 89, n. 1, p. 287–295.

NATARAJAN, A. T. (1993) Techniques for biomonitoring of human populations for genetic effects. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, n. 3, p. 841-847.

NCBI MAP Viewer. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>>. Acesso em: 16 dez. 2008.

NCBI, 2008. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=2944&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum>. Acesso em: 13 nov. 2008.

NELSON, H. H. *et al.* (2002) The *XRCC1 Arg399Gln* Polymorphism, Sunburn, and Non-melanoma Skin Cancer: Evidence of Gene-Environment Interaction. **Cancer Research**, v. 62, p. 152–155.

PAGANI, F; BARALLE, F. E. (2004) Genomic variants in exons and introns: Identifying the splicing spoilers. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 389–396.

PEARSON, W. R. *et al.* (1993) Identification of Class-mu Glutathione Transferase Genes GSTMI-GSTMS on Human Chromosome 1p13. **American Journal of Human Genetics**, v. 53, p. 220-233.

PELLMAR, T. C. *et al.* (1999) Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. **Toxicological Sciences**, v. 49, n. 1, p. 29–39.

PERERA, F. P.; WEINSTEIN, I. B. (1982) Molecular epidemiology and carcinogen-DNA adduct detection: new approaches to studies of human cancer causation. **Journal of Chronic Diseases**, v. 35, p. 581–600.

PIERCE, A. J. *et al.* (1999) XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. **Genes & Development**, v. 13, p. 2633–2638.

PITARQUE, M. *et al.* (1999) Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. **Mutation Research**, v. 441, p. 115–127.

PONNAIYA, B. *et al.* (2004) Detection of chromosomal instability in α -irradiated and bystander human fibroblasts. **Mutation Research**, v. 568, p. 41–48.

van POPPEL, G. *et al.* (1992) Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 2, p. 303-305.

PRAT, O. *et al.* (2005) Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. **Proteomics**, v. 5, p. 297-306.

RAMACHANDRAN, S. *et al.* (2006) Single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* and *XPB* and its molecular mapping in Indian oral cancer. **Oral Oncology**, v. 42, p. 350–362.

RERICHA, V. *et al.* (2006) Incidence of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma in czech uranium miners: a case–cohort study. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 6, p. 818 – 822.

RIBERA, D. *et al.* (1996) Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 146, p. 53-89.

ROOSEVELT, A. C. **Amazonian Indians from Prehistory to the Present: Anthropological Perspectives**. University of Arizona Press, 1997.

ROSSIT, A. R. B. *et al.* (2002) Polymorphisms in the DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. **Cancer Letters**, v. 180, p. 173–182.

SAMBROOK, J.; FROTSCH, E. F.; MANIATIS, T. Isolation of DNA from mammalian cells. In: FORD, N.; NOLAN, C.; FERGUSON, M. **Molecular Cloning**, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p. 916–919.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467.

SBPC - (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência). CNEN estuda radiação natural de Monte Alegre. **Jornal da Ciência**, Rio de Janeiro, 3 jul. 2003. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=10256>>. Acesso em 12 jul. 2007.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, I. **Arlequin v. 3.1: A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SCHRODER, H. *et al.* (2003) Chromosome aberration analysis in peripheral lymphocytes of Gulf War and balkans war veterans. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 103, n. 3, p. 211-219.

SCHUBAUER-BERIGAN, M. K. *et al.* (2007) Chronic lymphocytic leukaemia and radiation: findings among workers at five US nuclear facilities and a review of the recent literature. **British Journal of Haematology**, v. 139, p. 799–808.

SEEDHOUSE, C. *et al.* (2004) Polymorphisms in Genes Involved in Homologous Recombination Repair Interact to Increase the Risk of Developing Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 10, 2675–2680.

SEIDEGÅRD, J. *et al.* (1990) Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. **Carcinogenesis**, v. 11, n. 1, p. 33-36.

SEILER, R. L. (2004) Temporal changes in water quality at a childhood leukemia cluster. **Ground Water**, v. 42, p. 446-55.

SHEN, H. *et al.* (2004) Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC3 Thr241Met* and risk of gastric cancer in a Chinese population. **Cancer Letters**, v. 206, p. 51–58.

SHEN, M. *et al.* (2007) Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. **Haematologica**, v. 92, p. 1180–1185.

SHEN, M. R.; JONES, I. M.; MOHRENWEISER, H. (1998) Nonconservative Amino Acid Substitution Variants Exist at Polymorphic Frequency in DNA Repair Genes in Healthy Humans. **Cancer Research**, v. 58, p. 604-608.

SHU, X.-O. *et al.* (2003) A Population-Based Case-Control Study of the *Arg399Gln* Polymorphism in DNA Repair Gene *XRCC1* and Risk of Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, p. 1462–1467.

SILVA, J. *et al.* (2000) Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis** v. 35, p. 270-278.

SILVA, J. *et al.* (2008) Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. **Mutagenesis**, v. 23, n. 5, p. 415 – 422.

SINGH, N. P. *et al.* (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 75, 184-191.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER, L. (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. **Heredity**, v. 76, p. 377-383.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. (1999) 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.

STEARNS, D. M. *et al.* (2005) Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. **Mutagenesis**, v. 20, 417–423.

STRANGE, R. C. *et al.* (1991) The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. **Carcinogenesis**, v.12, n.1, p. 25-28.

STREFFER, C. *et al.* (2002) Genomic instability in uranium miners after high radiation exposures. **International Congress Series**, v. 1225, p. 223–227.

TALALAY, P. *et al.* (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. **Toxicology Letters**, v. 82-83, p. 173-179.

TAYLOR S.; McINTOSH, A.; WALKER, T. (2001) The collapse of ‘geologic time’. **Creation**, v. 4, p. 30 – 34.

TEBBS, R. S. *et al.* (1995) Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the *XRCC3* DNA repair gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 6354-6358.

THIÉBAULT, C. *et al.* (2007) Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52^E) proximal cells. **Toxicological Sciences**, v. 98, n. 2, 479–487.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7369-7375.

TRIZNA, Z. *et al.* (1995) Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. **American Journal of Surgery**, v. 170, n. 5, p. 499-501.

TUDEK, B. (2007) Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 258–275.

URNOVITZ, H. B. *et al.* (1999) RNAs in the sera of Persian Gulf War veterans have segments homologous to chromosome 22q11.2. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 3, p. 330–335.

VACQUIER, B. *et al.* (2009) Radon-associated lung cancer risk among French uranium miners: modifying factors of the exposure–risk relationship. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 48, p. 1–9.

VISPÉ, S. *et al.* (2000) A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosylation) in response to DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 9886–9891.

VODICKA, P. *et al.* (2004) Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. **Carcinogenesis**, v. 25 n. 5, p. 757-763.

WANG, L. Q. *et al.* (2006) Relationship between polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to radiation injury. **Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v. 24, n. 8, p. 479-482.

WERBROUCK, J. *et al.* (2008) Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: Association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. **Mutation Research**, v. 656, p. 74–81.

WILSON, D. M. The DNA Repair Interest Group. Disponível em: <<http://bbrp.llnl.gov/repair/html/ber2.html>>. Acesso em: 18 dez. 2008

WINSEY, S. L. *et al.* (2000) A Variant within the DNA Repair Gene *XRCC3* is associated with the development of melanoma skin cancer. **Cancer Research**, v. 60, p. 5612–5616.

WRIXON, A. D. (2008) New ICRP recommendations. **Journal of Radiological Protection**, v. 28, p. 161–168.

XU, S.-J. *et al.* (1998) Characterization of the Human Class Mu Glutathione *S*-Transferase Gene Cluster and the *GSTM1* Deletion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, 3517-3527.

YANG, Z. H. *et al.* (2007) Genetic polymorphisms of the DNA repair gene and risk of nasopharyngeal carcinoma. **DNA and Cell Biology**, v. 26, p. 491–496.

ZHANG, Q. *et al.* (1999) Changes in immune parameters seen in Gulf War veterans but not in civilians with chronic fatigue syndrome. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n.1, p. 6–13.

ZHAO, B. *et al.* (2001) Dietary isothiocyanates, glutathione *S*-transferase -M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among chinese women in Singapore. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 1063–1067.

ZIJNO, A. *et al.* (2006) Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects. **Mutation Research**, v. 600, p. 184–192.