

Cristiny Gomes Hozumi

***Determinação da Frequência de Polimorfismos em Genes relacionados à
Manutenção da Estabilidade do Genoma na População Residente dos Municípios
de Monte Alegre, PA.***

Dissertação aprovada para obtenção
do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Radioproteção e Dosimetria
do Instituto de Radioproteção e Dosimetria
da Comissão Nacional de Energia Nuclear na
área de Biofísica das Radiações

Orientador: Dr. Carlos Eduardo B. de
Almeida - IRD/CNEN

Co-orientadora: Dra. Lene Veiga
IRD/CNEN

Rio de Janeiro – Brasil
Instituto de Radioproteção e Dosimetria - Comissão Nacional de Energia Nuclear
Coordenação de Pós-Graduação

2010

Hozumi, Cristiny Gomes

Determinação da Frequência de Polimorfismos em Genes relacionados à Manutenção da Estabilidade do Genoma na População Residente dos Municípios de Monte Alegre, PA/

Cristiny Gomes Hozumi – Rio de Janeiro, IRD, 2003.

Xvii, fl.61 : il. ; 29cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Radioproteção e Dosimetria – Rio de Janeiro, 2010

1.Radiação Ionizante. 2.p53. 3.h OGG1. I. XRCC3. 4-
Mecanismos de reparo. 6. Polimorfismo
I. Instituto de Radioproteção e Dosimetria. II.Título

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear, sob orientação do Prof^o Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida no Laboratório de Radiobiologia, tendo como co-orientadora a Dra. Lene do Serviço de Avaliação de Impacto Ambiental.

Dedicatória:

A todos aqueles que acreditaram em meu potencial e sonharam comigo a finalização de mais uma etapa. Aqui deixo meu amor e carinho em retribuição.

Agradecimentos:

A Deus por ser a fonte de toda a justiça, paz e alegria em minha vida profissional e pessoal.

Ao meu orientador Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida a quem honro e agradeço pela dedicação, investimento, conversas e experiências aprendidas no laboratório.

A minha co-orientadora Dra. Lene Veiga, a qual foi a responsável pela informação epidemiológica do projeto e nos apoiou sempre que requisitada.

A Comissão de Energia Nuclear pelo suporte financeiro através do programa de bolsas de Ensino.

A toda a equipe do Dr. Sergio Koifman da ENSP da Fundação Oswaldo Cruz, que nos ajudou com a aquisição de material e informações muito úteis para a realização desse trabalho.

A aluna de doutorado Leticia Melo do Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente da ENSP que realizou o trabalho na região de estudo e nos contribuiu com informações e experiências de campo imprescindíveis para a realização do trabalho.

Aos funcionários do setor DEMIN do Instituto de Radioproteção e Dosimetria onde encontrei suporte e ajuda de grupos de laboratórios sempre dispostos a nos ajudar. Especialmente ao Wanderson, Estela e Sueli pela paciência e ajuda em meus experimentos.

Ao professor Evaldo Simões da Fonseca que sempre me incentivou na carreira acadêmica e me inspira a continuar a sonhar alto e trazer inovações para o desenvolvimento científico.

A minha eterna amiga Samira que contribuiu muito com meu crescimento profissional e pessoal dentro do laboratório de Radiobiologia me ensinando suas experiências.

A amiga Isabelle a qual sempre se mostrou prestativa me auxiliando na realização de experimentos além de ser uma grande companheira.

A pesquisadora Mônica Stuck de Oliveira que sempre contribuiu com informações e experiências profissionais, além de sua companhia super agradável nos horários de almoço.

Aos colegas do laboratório de Radiobiologia por terem contribuído com a dissertação e aprendizado de técnicas, me ensinando e estando ao meu lado durante período: Amanda, Leonardo e Hugo.

Às amigas que fizeram e fazem parte da minha historia e que acompanham cada etapa da minha vida: Ana Paula, Bianca, Carol e Lydia.

A Ricardo, Aline, Talita e Letícia por fazerem diferença e serem imprescindíveis em minha vida pela amizade e cuidado do meu caráter.

Ao meu irmão André que esta ao meu lado e tem me ensinado como acreditar que vale a pena acreditarmos em nossos sonhos.

Ao meu noivo Paulo que é e sempre será o homem que admiro e que me inspira a ser uma mulher virtuosa, honrando os princípios morais.

Aos meus pais os quais eu amo e agradeço por investirem em toda a minha vida no meu futuro, principalmente em relação aos meus estudos, sabendo que esses seriam a maior herança que poderia receber. Muito obrigada.

Resumo

A exposição do homem à radiação ionizante oriunda de fontes naturais é uma característica inerente à vida dos seres humanos na Terra, pois o homem e todos os seres vivos sempre foram expostos a essas fontes. A radiação ionizante é um reconhecido agente genotóxico o qual pode afetar a estabilidade genômica e genes relacionados ao reparo de DNA podem ter seu papel comprometido quando apresentam determinado polimorfismo. Este trabalho teve como objetivo analisar a frequência de polimorfismos (SNP) nos genes de reparo de DNA e de controle de ciclo celular: hOGG1(Ser326Cys), XRCC3(Thr241Met) e p53(Arg72Pro), em amostras de saliva de uma população do Município de Monte Alegre, no estado do Pará. Foram realizadas coletas em agosto de 2008 sendo 40 amostras de homens e 46 amostras de mulheres, somando no total 86 amostras. Através da técnica de RFLP foi determinada a frequência dos genótipos homocigotos e/ou heterocigotos de genes polimórficos. O gene hOGG1 teve 5% da presença do alelo 326Cys, no gene XRCC3 encontramos cerca de 21% do alelo 241Met e o gene p53 apresentou 40,8% do alelo 72Pro. E as frequências genotípicas dos indivíduos para os três genes foram de 91,04%, 88,06% e 59,7% para genótipo homocigoto selvagem, 5,97%, 11,94% e 22,39% para genótipo heterocigoto e 2,99%, zero e 17,91% para homocigoto polimórfico, respectivamente nos genes hOGG1, XRCC3, p53. Esses valores estão semelhantes aos encontrados em estudos anteriores. A influência desses polimorfismos, os quais, estão envolvidos no reparo do DNA e a conseqüente genotoxicidade induzida pela radiação depende da dose de exposição e de fatores como o fumo, que estatisticamente é um fator para vigilância à saúde pública na região. Esse estudo reuniu informações moleculares e fatores epidemiológicos em Monte Alegre que contribuíram para uma caracterização da população local.

Palavras-chave: *Radiação Ionizante, polimorfismo, XRCC3, p53 e hOGG1*

Abstract

The human exposure to ionizing radiation coming from natural sources is an inherent feature of human life on earth, for man and all living things have always been exposed to these sources. Ionizing radiation is a known genotoxic agent which can affect the genomic stability and genes related to DNA repair may play a role when they have committed certain polymorphism. This study aimed to analyze the frequency of polymorphisms (SNPs) in genes of DNA repair and cell cycle control: hOGG1 (Ser326Cys), XRCC3 (Thr241Met) and p53 (Arg72Pro) in saliva samples from a population located Monte Alegre, state of Pará were collected in August 2008 and 40 samples of men and 46 samples of women, adding a total of 86 samples. By RFLP was determined the frequency of homozygous genotypes and / or heterozygous for polymorphic genes. The hOGG1 gene was 5% of the allele 326Cys, XRCC3 gene found about 21% of the allele 241Met and p53 gene showed 40.8% of the 72Pro allele. And the genotype frequencies of individuals for the three genes were 91.04%, 88.06% and 59.7% for homozygous wild genotype, 5.97%, 11.94% and 22.39% for heterozygote genotype and 2.99%, zero and 17.91% for homozygous polymorphic hOGG1 genes respectively, XRCC3, p53. These values are similar to those found in previous studies. The influence of these polymorphisms, which are involved in DNA repair and consequent genotoxicity induced by radiation depends on dose and exposure factors such as smoking, which is statistically a factor in public health surveillance in the region. This study gathered information and molecular epidemiology in Monte Alegre, that help to characterization of local population.

Keywords: Ionizing Radiation, polymorphisms, XRCC3, hOGG1 and p53

Índice

1. Introdução	pág.01
2. Objetivo Geral	pág.03
2.1. Objetivos Específicos	pág.03
3 . Fundamentos Teóricos	pág.04
3.1. Exposição a radioatividade Natural	pág.04
3.2. Exposição a radiação natural em Monte Alegre, PA	pág.05
3.3. As radiações ionizantes , o DNA e o Câncer	pág.07
3.4. O ciclo celular e o Reparo	pág.08
3.5. Vias de reparo de DNA de interesse	pág.11
3.6 . Reparo por excisão de bases (BER)	pág.12
3.7. Recombinação Homóloga	pág.14
3.8 . Polimorfismos Genéticos	pág.17
3.9 - Polimorfismos dos genes de estudo	pág.18
4. Metodologia	pág.24
4.1. Área de Estudo	pág.24
4.2. Escolha dos indivíduos e coletas das amostras	pág.26
4.3. Purificação do DNA	pág.26
4.4. Quantificação de DNA	pág.27

4.5. Amplificação PCR -----	pág.28
4.6. Polimorfismo no comprimento de fragmentos de Restrição – -RFLP -----	pág.29
4.7. Análise estatística dos polimorfismos encontrados-----	pág.30
4.8. Inquérito epidemiológico realizado na população de Monte Alegre-----	pág.30
5 . Resultados -----	pág.31
5.1. Qualidade das amostras -----	pág.31
5.2. Análise da frequências dos alelos-----	pág.31
5.3. Análises das frequências genotípicas-----	pág.32
5.3.1. Frequência genotípica de acordo com sexo e idade-----	pág.32
5.3.2. Frequência genotípica entre grupos populacionais expostos a fatores de riscos externo para câncer-----	pág.33
5.3.3 – Frequência genotípica entre indivíduos que apresentam doenças crônicas-----	pág.34

5.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg-----	pág.36
6. Discussão -----	pág.38
7. Conclusão-----	pág.41
8. Referências bibliográficas -----	pág.42
Anexo 1 -----	pág.53
Anexo 2 -----	pág.55

Lista de Figuras

1. Mecanismos de reparo aos diferentes agentes causadores de dano ao DNA ----
-----pág.12
2. Reparo por excisão de base do gene hOGG1 -----pág.14
3. Reparo por recombinação homóloga-----pág.16
4. Gene hOGG1 ,localizado no cromossomo: 3; Posição: 3p26.2-----pág.19
5. Gene XRCC3, cromossomo: 14; Posição: 14q32.3-----pág.22
6. Gene p53, cromossomo: 17; Posição: 17p13.1-----pág.24
7. Mapa da Região norte abrangendo Monte Alegre e cidades próximas---pág.27

Lista de Tabelas

Tabela 1- Condições físicas dos genes no processo de amplificação das amostra -----
-----pág.28

Tabela 2 – Primers específicos de cada gene para a realização do PCR-----pág.29

Tabela 3 – Genes e suas enzimas de restrições correspondentes -----pág.30

Tabela 4 -Tamanho dos fragmentos de interesse após o corte com cada enzima de
restrição -----pág.30

Tabela 5 – Frequência nos alelos polimórficos dos genes de estudo -----pág.32

Tabela 6 – Frequências genotípicas para os três genes em relação ao sexo e a idade
dos indivíduos estudados -----pág.33

Tabela 7 -Frequências genotípicas para os três genes em relação ao tercil específico
e o fumo dos indivíduos estudados -----pág.34

Tabela 8 – Frequência genotípica dos indivíduos e doenças associadas-----pág.36

Tabela 9 – Valores das frequências observadas e esperadas -----pág.37

Tabela 10 - Valor dos alelos p e q para os genes estudados -----pág.37

Lista de Abreviaturas e Siglas

AP	Sítioapurínico ou apirimidínico
ATM	ataxia-telangiectasia mutado
BER	Reparo por excisão de bases
Cdk2	<i>Cyclin-dependent kinases</i> na fase S do ciclo celular
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CPRM	Companhia de Pesquisas de Recursos Naturais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
gap	Intervalo
hOGG1	human 8-oxoguanine DNA glycosylase
HWE	Equilíbrio de Hardy Weinberg
INB	Indústrias Nucleares Brasileiras
IR	Radiação Ionizante
LET	Transferência Linear de Energia
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de polimerase cadeia

RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
UV	Ultravioleta
uvrA, uvrB e uvrC	Raios ultravioletas A, B e C
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC3	<i>X-Ray repair cross-complementing group 3</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
8-oxoG	8-hidroxiguanina

Lista de Símbolo

%	Porcentagem
g	Gravidade
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
Bq	Bequerel
bp	pares de base

1- INTRODUÇÃO

Polimorfismos genéticos são variações naturais na sequência de DNA ou do cromossomo. Os mesmos são considerados relevantes para a análises, quando ocorrem em mais de 1% de uma população (GeneTest, 2009). Tem sido demonstrado que a existência de polimorfismos em genes envolvidos na resposta celular ao dano no DNA pode alterar a função de uma proteína e a capacidade individual de manutenção da estabilidade genômica (GOODE *et al.*, 2002).

O organismo possui diferentes sistemas de reparo de DNA, os quais visam manter a integridade do genoma humano e garantir a sobrevivência do organismo frente aos efeitos deletérios causados por fatores endógenos e exógenos (LIMA, *et al* 2001). A presença de polimorfismos genéticos no processo de reparo do DNA pode influenciar na variação individual da capacidade de reparo do material genético e conseqüentemente influenciar na maior susceptibilidade para o desenvolvimento de câncer (FORD *et al.*, 2002; RUTTAN & GLICKMAN, 2002). Em populações com maior frequência destes polimorfismos, a exposição a agentes carcinógenos, como a radiação ionizante, pode aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer.

A população de Monte Alegre tem sido alvo de diversos estudos, uma vez que os níveis aumentados de radioatividade natural na cidade levantaram rumores de que a população apresenta elevados taxas de incidência de câncer advinda da exposição a radiação natural. Melo (1999) reporta que os níveis de radioatividade em Monte Alegre são compatíveis com outras área de radioatividade natural elevada no Brasil e no mundo onde não se observou nenhum aumento na incidência de câncer que possa ser atribuído a radiação.

Uma vez que não existe na região registro de câncer de base populacional, não foi possível avaliar até então se a incidência de câncer na região é aumentada comparada com outros municípios de mesmo padrão sócio-econômico. Melo (2009)

realizou um levantamento da mortalidade por câncer e por todas as causas na cidade de Monte Alegre e cidades vizinhas. Os resultados demonstram que ao padrão de mortalidade por câncer em Monte Alegre não é diferente do que se poderia esperar para a região, tendo como base a taxa de mortalidade por câncer do Estado do Pará. No entanto, a taxa de mortalidade por câncer não é um indicativo da incidência, pois reflete, entre outros aspectos, as condições de acesso e da qualidade ao tratamento médico. Desta forma, desconhece-se se a incidência de câncer na região é aumentada em relação a municípios vizinhos.

No presente estudo, pretende-se avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes, hOGG1, XRCC3 e p53 que estão relacionados a manutenção da estabilidade genômica, em indivíduos selecionados da população de Monte Alegre, que poderiam conferir uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer, quando expostos a agentes carcinógenos ambientais, como a radiação ionizante.

2 - Objetivo Geral

Caracterização dos polimorfismos dos genes hOGG1 (Ser326Cys), XRCC3(Thr241Met) e p53 (Arg72Pro) relacionados a estabilidade genômica em indivíduos da população de Monte Alegre.

2.1 - Objetivos Específicos

Avaliação da frequência genotípica por sexo e idade;

Avaliação da frequência genotípica para grupos populacionais expostos a fatores de riscos para o câncer como exposição a radiação e fumo;

Avaliação da frequência genotípica entre indivíduos que apresentam doenças crônicas.

3. Fundamentos Teóricos

3.1. Exposição a radioatividade Natural

De uma forma geral, podemos considerar que existem duas fontes principais que contribuem para exposição natural: a radiação cósmica devida a radionuclídeos cosmogênicos, e aquela associada aos radionuclídeos naturais presentes na crosta terrestre (UNSCEAR, 2006).

A exposição à radiação natural também pode ser influenciada por atividades humanas e hábitos de vida. Isto é particularmente importante para a exposição ao radônio e seus filhos de meia-vida reduzida, sendo fortemente dependente do local onde um determinado grupo populacional está situado, do tipo de construção que caracteriza sua moradia, incluindo o tipo de material utilizado em sua construção e, finalmente, da ventilação destas construções (KREWSKI, 2005).

As doses decorrentes da inalação de radônio e da exposição à radiação gama terrestre contribuem com a maior fração de exposição à radiação natural em seres humanos, contribuindo juntas com cerca de 70% da dose total recebida anualmente pelo homem devido á fontes naturais (UNSCEAR, 2006).

O radônio é um gás radiativo que se origina no decaimento do Ra^{226} (radionuclídeo pertencente à série do U^{238}). A importância do radônio, do ponto de vista dos efeitos biológicos, decorre da radiotoxicidade de seus produtos α -emissores de meia-vida curta, o Po^{218} e o Po^{214} , e de sua maior abundância no meio ambiente (NRC, 1988).

A energia das partículas alfa liberadas pelos produtos de decaimento (Po^{218} e o Po^{214}) depositada nas células do epitélio respiratório é considerada a causa primária

da formação do câncer de pulmão em indivíduos expostos. Existem vários estudos epidemiológicos que demonstram a associação entre a exposição ao radônio e o câncer de pulmão (UNSCEAR, 2006).

3.2. Exposição a radiação natural em Monte Alegre, PA

A cidade de Monte Alegre está localizada ao noroeste do Estado do Pará e é uma das mais antigas povoações da Amazônia, cujo assentamento ocorreu há milhares de anos. Geologicamente, a área situa-se na porção central da Bacia Sedimentar do Amazonas, onde ocorrem rochas com idades do Paleozóico ao Quaternário (ROOSEVELT *et al*, 1996).

Levantamentos radiométricos e caracterizações geológicas realizadas pela Companhia de Pesquisas de Recursos Naturais (CPRM), órgão do Ministério das Minas e Energia, revelaram ocorrências de urânio na área do Domo de Monte Alegre (PASTANA, 1999). A radioatividade das rochas passou a constituir um problema para a população de Monte Alegre, principalmente na Vila Inglês de Souza, a partir do momento em que o material radiativo começou a ser utilizado na construção civil, notadamente no revestimento interno de residências, pavimentação de calçadas e ruas.

No entanto, a radioatividade natural em Monte Alegre é compatível com os níveis encontrados em outras cidades do Brasil e do mundo, desta forma, não se pode afirmar que a incidência de câncer na região é aumentada, conforme divulgado na imprensa local. (VEIGA *et al*, 2003).

A Nuclebrás, atual Indústrias Nucleares Brasileiras, INB realizou um trabalho na área do domo de Monte Alegre onde revelaram anomalias de urânio (U_3O_8) no membro Barreirinha que registravam valores de 40 e 160 ppm de urânio, em sedimentos de corrente na área do Domo. A presença dessa ocorrência uranífera foi

investigada com o objetivo de avaliar a viabilidade econômica para exploração da jazida (PEREIRA, 1988).

Em 1995, equipes de geólogos e geofísicos da Universidade Federal do Pará (UFPA) iniciaram um projeto para investigar os níveis de radioatividade natural na cidade. No mesmo ano da realização destas medidas, a equipe da UFPA solicitou a colaboração da CNEN para investigar um possível aumento da exposição à radioatividade natural da população de Monte Alegre. Um grupo de técnicos da CNEN realizou amplo levantamento dos níveis de exposição ao radônio, nas residências de Monte Alegre e de Inglês de Souza. Os resultados deste estudo mostraram que, das 33 residências monitoradas na cidade de Monte Alegre, a concentração média de radônio no ar foi de 75 Bq/m^3 , variando de 22 a 188 Bq/m^3 . Na região de Inglês de Souza, a média de concentração de atividade de radônio nas 19 residências monitoradas foi de 116 Bq/m^3 , variando de 40 a 338 Bq/m^3 (MELO, 1999).

A radioatividade natural em Monte Alegre é compatível com os níveis encontrados em outras cidades do Brasil e do mundo.

Uma vez que existe uma preocupação pública a respeito dos riscos da exposição à radiação ionizante no município de Monte Alegre onde a população sofreu discriminação e prejuízos econômicos, O Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPQ) financiou um projeto de pesquisa do CNPQ da Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz e o Instituto de Radioproteção e Dosimetria com o objetivo de realizar uma ampla caracterização radiológica e epidemiológica na região.

Um importante aspecto a ser estudado em populações expostas a agentes carcinógenos é a caracterização de polimorfismos em genes relacionados à manutenção da estabilidade do genoma. No caso específico de Monte Alegre, a hipótese do estudo estaria centrada no fato de que a combinação entre variantes polimórficas ocorridas em genes relacionados com manutenção da estabilidade do

genoma poderia conferir maior risco ao câncer em pessoas expostas a radiação ionizante. É importante ressaltar que os efeitos de um polimorfismo podem tornar-se aparentes somente quando da exposição a agentes genotóxicos endógenos ou ambientais (BÔER, 2002, THACKER, 2005, HARMS, 2004).

Embora a radiatividade natural em Monte Alegre seja compatível, e até mesmo menor, que os níveis encontrados em outras cidades do Brasil e do mundo, não se pode afirmar nem negar, até o momento, se realmente a incidência de câncer na região é aumentada, conforme divulgado na imprensa local.

Melo, 2009 reporta que as taxas de mortalidade padronizadas para o conjunto de neoplasias em Monte Alegre mantiveram-se estáveis no período, mesmo para algumas neoplasias reconhecidas como sendo rádioinduzidas (pulmão, mama feminino, esôfago e leucemia). Os resultados encontrados não evidenciam uma elevação da mortalidade geral, nem por neoplasias em Monte Alegre, assim como o padrão de distribuição não se diferencia substancialmente daquele observado em municípios vizinhos com características sócio-demográficas similares.

3.3. As radiações ionizantes , o DNA e o Câncer

O DNA é um dos principais alvo da radiação ionizante (RI) e sofre vários tipos de lesões, incluindo alterações de base, quebras de fita simples (SSBs), e duplas (DSBs) e, ainda, o dano oxidativo (LIU *et al.*, 2001; ANTONELLI *et al.*, 2002). À medida que a intensidade da ionização aumenta, aumenta a probabilidade de deposição da energia diretamente na molécula biológica, ou seja, de ocorrer lesão celular. A radiação irá interagir de forma direta ao DNA ou indireta por meio das moléculas de água, gerando radicais livres e provocar lesões de grande complexidade no DNA (HADA, 2008).

Segundo Little (2003), o que diferencia a RI de outros agentes químicos ou físicos carcinogênicos, os quais podem ser específicos para certos tecidos, é a sua

capacidade de penetrar nas células sem ser impedida por barreiras celulares. Assim, todas as células do corpo são susceptíveis aos danos provocados pela RI. Este, não é por si só, o fator determinante do processo de carcinogênese, pois o câncer é formado progressivamente a partir do acúmulo de eventos mutacionais, sendo que a frequência desses eventos pode variar de acordo com outros fatores, como pré-disposição genética, hábitos de vida e fatores ambientais.

Estudos feitos entre os sobreviventes de bomba atômica e entre pacientes que se submeteram à radioterapia, mostram que o risco de câncer aumenta em proporção direta à dose de radiação recebida, e que os tecidos mais sensíveis às radiações ionizantes são o hematopoético, o tireoideano, ósseo e mamário (BOICE, 2006).

3.4. O ciclo celular e o Reparo

O ciclo celular, período entre duas divisões mitóticas consiste em uma sequência ordenada de fases extremamente reguladas: G1 (Gap1), S (Síntese), G2 (Gap2) e M (Mitose). A execução precedida dos eventos de checagem é de extrema importância para o sucesso da etapa seguinte e a obtenção final de células-filhas normais. Ao longo do ciclo há alguns *checkpoints* que garantem a produção de células filhas geneticamente idênticas localizados em G1, G2, M. O progresso de uma célula durante cada uma das diversas etapas de divisão é regulada por sinais tanto extracelulares quanto intracelulares. A grande maioria das moléculas responsáveis por estas etapas são as ciclinas que durante o curso do ciclo celular possuem um período de síntese crescente seguido por outro de rápida degradação, e as cinases, que quando ativadas por ciclinas fosforilam as moléculas necessárias para a divisão celular (LEWIN, *et al* 1997).

A capacidade de reconhecer o DNA danificado e de, simultaneamente, regular a progressão do ciclo celular e reparar o DNA é a chave para a manutenção da

estabilidade genômica. As células respondem às lesões no DNA por meio da ativação de um complexo mecanismo que envolve a ativação transcricional e pós-transcricional de grupos de genes incluindo aqueles associados ao bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA e, em algumas circunstâncias, à apoptose (KHANNA & JACKSON, 2001), dependendo da extensão dos danos no DNA e do tipo celular.

Os pontos de checagem presentes no ciclo celular, asseguram a correta execução dos eventos do ciclo, garantindo, dessa forma, a estabilidade genética. O ponto de checagem é um mecanismo de feedback que controla o ciclo celular e inibe o início de eventos subsequentes até que os processos da etapa anterior sejam executados com sucesso (CHEN, *et al* 2007). Estes são ativados quando há a detecção de algum dano no DNA e permite, então, o reparo genético.

O gene supressor de tumor p53 está localizado no cromossomo 17 e possui importante papel na prevenção do desenvolvimento do câncer. O gene p53 é um fator de transcrição que regula o ciclo celular, funcionando como um gene supressor tumoral. Ele promove a apoptose ou interrompe o ciclo celular antes da duplicação da célula. Este gene aparece como o mais comumente mutado em diversos tipos de carcinoma (BOSARI *et al*, 2008).

A proteína estabilizadora MDM2 normalmente está ligada ao p53, inativando-o e transportando a p53 do núcleo celular para o citosol, onde ele é degradado. Após o estímulo inicial, a proteína p53 é fosforilada e rompe sua ligação com o MDM2. A proteína p53 pode, então, ligar-se ao DNA da célula, em genes que causam a interrupção do ciclo celular, apoptose e inibição da angiogênese. O gene p21 é um dos genes ativados pelo p53. Sua proteína p21, por sua vez, interage com a proteína estimuladora da divisão celular (cdk2), interrompendo o ciclo celular. O efeito imediato da indução da p21 é a inibição da atividade da proteína do retinoblastoma (pRB). A pRB na fase G1 encontra-se hipofosforilada e ligada a fatores de transcrição da família E2F; quando a pRB é fosforilada por cinases dependente de ciclinas, tais fatores são

liberados, resultando na transcrição de genes da fase S do ciclo celular. Esta via, a p21 inibe o complexo de CDKs, resultando no acúmulo de pRB hipofosforilada, complexada a E2F parando o ciclo celular em G1. Esta parada é de fundamental importância para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação na fase S (ALBRECHTSEN, *et al.*, 1999). Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem de G1, possibilitando que células danificadas progridam para a fase S sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose (GRIVICICH, *et al.*, 2007).

Outra proteína relacionada ao controle do ciclo celular é a ATM (ataxia-telangiectasia mutado), responsável pela detecção do dano, especialmente de quebras duplas das fitas de DNA. O gene ATM é um supressor tumoral localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q22.3). A proteína ATM tem função de quinase e interage com as proteínas de progressão do ciclo celular BRCA1, p53, CHK2 e com as proteínas de checagem e de reparo do DNA. O gene ATM aumenta sua expressão como resposta após o dano ao DNA causado por radiação ionizante, com a função de interrupção do ciclo celular. Vários estudos demonstram a associação entre a mutação de uma das cópias do gene ATM e a suscetibilidade aumentada à radiação ionizante e câncer de mama (BLAND e COPELAND, 2004).

Além do controle do ciclo celular o organismo possui diferentes sistemas de reparo de DNA os quais visam manter a integridade do genoma humano. A presença de polimorfismos genéticos no processo de reparo do DNA pode influenciar na variação individual da capacidade de reparo do material genético, podendo estar associado a um maior risco de desenvolver o câncer (IMPROTA *et al.*, 2008).

Como exemplo desses genes temos o hOGG1 (Ser326Cys), XRCC3(Thr241Met) e p53 (Arg72Pro) os quais estão associados a diversos tipos de câncer, principalmente o de pulmão, gástrico e mama, quando apresentam sua forma

polimórfica (BERWICK & VINES, 2000, GOODE *et al* 2002, .ZIENOLDDINY *et al*, 2006).

3.5 - Vias de reparo de DNA de interesse

As vias de reparo de DNA são necessárias para manter a estabilidade genômica e garantir a sobrevivência do organismo, frente aos efeitos deletérios causados por fatores endógenos e exógenos (LIMA, *et al* 2001). As quebras duplas e simples das fitas podem ser formadas direta e/ou indiretamente em resposta à ação de agentes endógenos e exógenos, tais como radiação ionizante (DRISCOLL & JEGGO, 2006) sendo esta a principal fonte causadora de quebras simples (CALDECOTT, 2008). Uma vez que o dano seja localizado, moléculas específicas de reparo de DNA são enviadas ao local e se ligam à região ou nas proximidades do local do dano, incluindo outras moléculas para ligar e formar um complexo que habilita o reparo a agir no local. Se a taxa de danos no DNA exceder a capacidade da célula em repará-los, o acúmulo de erros pode subjugar a célula e resultar em senescência, apoptose ou câncer (VODICKA *et al*, 2004).

Em situações onde os danos não podem ser reparados (como no caso de quebras na cadeia de DNA causadas por radiações ionizantes, ou no caso do surgimento de dímeros de pirimidina), a replicação coordenada pela DNA-polimerase é abortada e a célula morre. Os principais mecanismos de reparo (Fig.1) podem ser divididos em : MMR (*MisMatch Repair*), BER (*Base excision repair*), NER (*Nucleotide excision repair*), Reparo por Recombinação Homóloga além do NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*) que são geralmente conhecidos como união terminal não-homóloga (HOEIJIMAKERS, 2001).

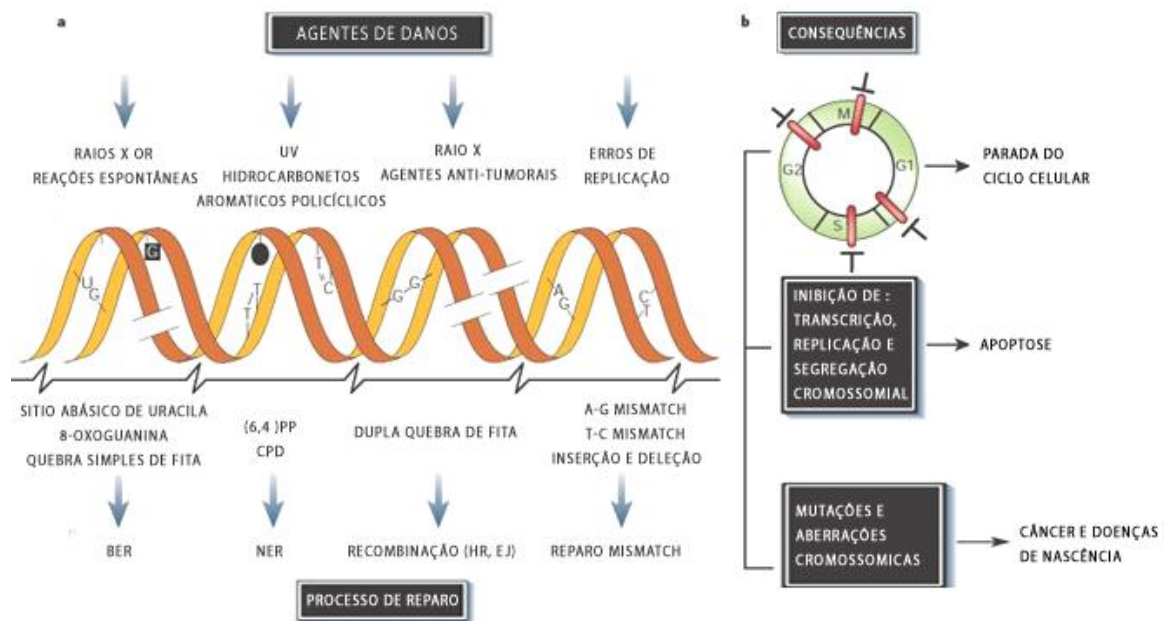


Fig1. Mecanismos de reparo aos diferentes agentes causadores de dano ao DNA

(Adaptado de Hoeijmakers, 2001)

3.6 - Reparo por excisão de bases (BER)

O reparo BER (*Base Excision Repair* ou reparo de excisão de bases) lida com danos em bases individuais realizando o reparo de lesões geralmente ocasionadas por processos oxidativos. Esse tipo de reparo tem início com a ação de DNA glicosilases que reconhecem e removem bases lesadas da cadeia do DNA pela quebra da ligação N-glicosil, a qual mantém a base nitrogenada associada com o esqueleto de açúcar-fosfato (FRIEDBERG et al., 1995). A maioria das DNA glicosilases reconhecem lesões específicas como a adenina metilada na posição 3 (STEINUM & SEEBERG, 1986) ou a 8-hidroxi guanina (BOITEAUX et al., 1992).

Após a retirada da base lesada gera-se no DNA um sítio apurínico ou apirimidínico (AP) que será reparado por AP endonucleases (DOETSCH & CUNNINGHAM, 1990). Os sítios AP também podem ser gerados por hidrólise natural

do DNA. As AP endonucleases geralmente são conhecidas por realizarem a quebra do esqueleto açúcar-fosfato na região 5' deste. O resultado dessa quebra gera duas terminações: uma 3'-OH e outra 5'-fosfato-desoxirribose. Essa etapa é realizada pela enzima DNA desoxirribo-fosfodiesterase (dRpase), para que uma DNA polimerase possa reconhecer e complementar a lacuna gerada pela retirada do nucleotídeo (FRIEDBERGE *et al.*,1995).

O gene hOGG1 é chamado de “*8-oxoguanine DNA glycosylase (Homo sapiens)*” e está localizado no cromossomo 3 do genoma humano. Seu produto (DNA glicosilase/AP liase) catalisa a excisão da base modificada do DNA, 8-hidroxi guanina (8-oxoG), durante o processo de reparação por excisão de bases (BOITEUX e RADICELLA, 2000). Essa lesão surge como resultado da exposição do DNA a espécies reativas de oxigênio (ERO) e à radiação ionizante. Trata-se de uma lesão extremamente mutagênica levando a transversões GC--TA (SHINMURA e YOKODA, 2001).

A enzima hOGG1 relacionada ao reparo por excisão de uma base, é uma peça fundamental no sistema de prevenção de danos oxidativos e o gene hOGG1 tem sido alvo de estudos já que é possível admitir que células sem o alelo funcional desse gene mostraram um fenótipo distinto, podendo, a partir desse, iniciar ou acelerar o processo carcinogênico (SHINMURA e YOKODA, 2001).

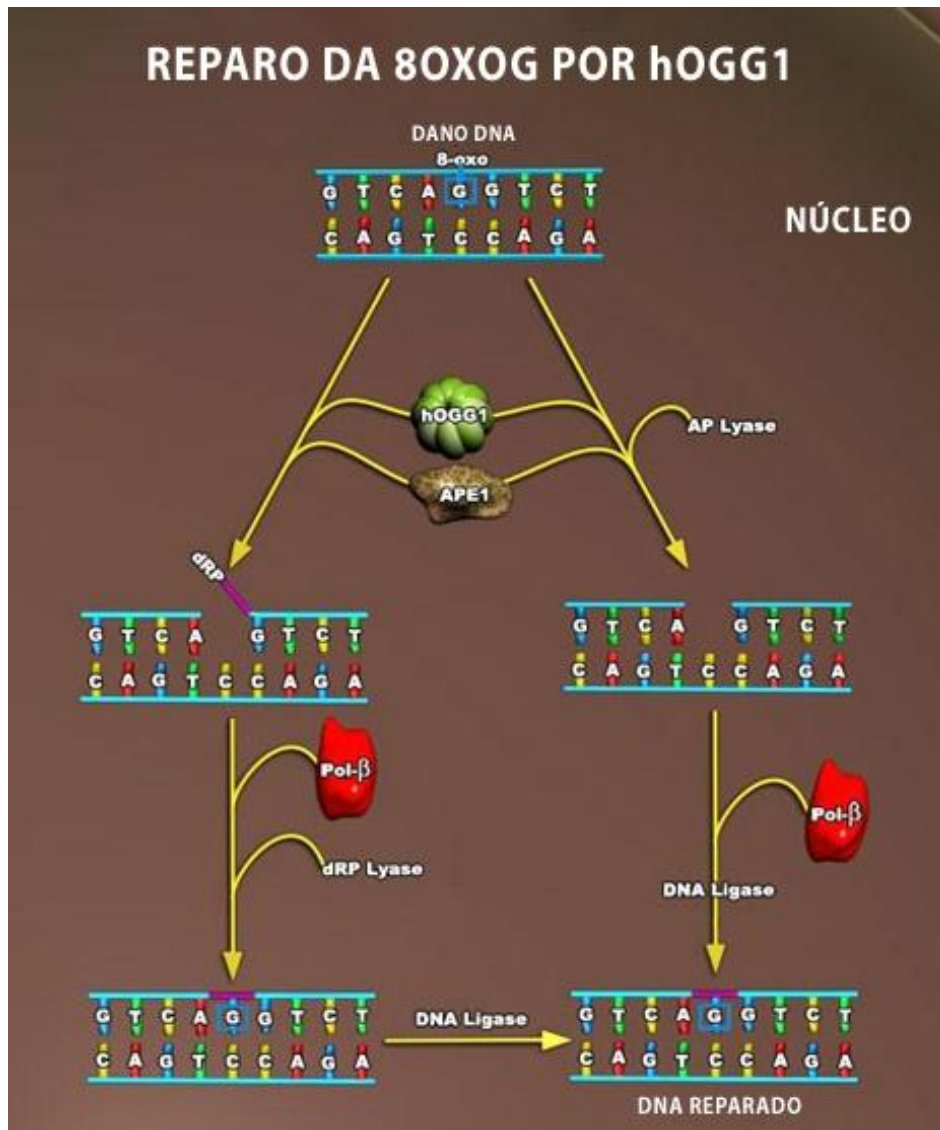


Fig.2 – Reparo por excisão de base do gene hOGG1- *Adaptação Applied BioSystems*

3.7 - Recombinação Homóloga

Esse tipo de reparo consiste em um processo de rearranjo físico que ocorre entre duas cadeias de DNA. É considerada como um tipo de recombinação genética que envolve o alinhamento de sequências similares, formação de uma junção de

Holliday (junção móvel de quatro cadeias de DNA) além de quebra e reparo, conhecido como resposta do DNA para produzir troca de material entre cadeias. O processo de recombinação homóloga (Fig. 3) ocorre naturalmente em organismos e é também utilizada como uma técnica de biologia molecular para introdução de mudanças genéticas num organismo. A recombinação homóloga constitui uma das vias de reparo de DSBs causadas pela RI, assim como por inibidores de topoisomerase II, na qual são utilizadas como molde as sequências homólogas das cromátides irmãs (OLIVEIRA, 2006).

O gene *X-Ray Repair Cross Complementing 3* (XRCC3) está localizado no cromossomo 14 e codifica uma proteína que relacionada à via de reparo. Ele desempenha um papel fundamental na via de reparo por recombinação homóloga já que este gene repara danos envolvendo quebras duplas de DNA. A proteína XRCC3 interage com RAD-51 formando um filamento de nucleoproteína que permitirá o alinhamento de regiões homólogas de DNA para o reparo (HOEIJMAKERS, 2001; CHRISTMANN *et al.*, 2003).



Fig. 3 Representação esquemática por recombinação homóloga

3.8 - Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos genéticos, que são variações naturais na sequência de DNA ou cromossomo. Um *polimorfismo genético* pode criar ou destruir sítios de enzimas de restrição e, quando associados a apenas uma base, são chamados de Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs).

Os SNPs são tipos de marcadores moleculares capazes de diferenciar indivíduos por meio de variações em apenas um nucleotídeo de sequências de DNA que codificam (ou não) genes. São considerados 90% dos tipos de polimorfismos encontrados no DNA Humano (SMITH *et al.*, 2003). Os SNPs mais comuns, encontrados em diferentes espécies, são os de transição (em que uma base púrica é substituída por outra púrica) e de transversão (em que uma base púrica é substituída por uma pirimídica, ou vice-versa).

Tem sido demonstrado que a existência de polimorfismos em genes envolvidos na resposta celular ao dano no DNA pode alterar a função de uma proteína e a capacidade individual de manutenção da estabilidade genômica (GOODE *et al.*, 2002). Um importante aspecto a ser estudado em populações expostas a agentes carcinógenos é a caracterização de polimorfismos em genes relacionados à manutenção da estabilidade do genoma.

Diversos polimorfismos de um único nucleotídeo nessa classe de genes têm sido caracterizados em diversos grupos de indivíduos (FORD *et al.*, 2002; RUTTAN and GLICKMAN, 2002) sendo que em alguns casos essas mutações esporádicas encontram-se associadas a um aumento do risco de vários tipos de câncer (GOODE *et al.* 2002).

Polimorfismos não afetam apenas a susceptibilidade às doenças, mas também podem influenciar na resposta ao tratamento terapêutico de pacientes (FORD, 2002)

3.9 - Polimorfismos dos genes de estudo

hOGG1

O polimorfismo no gene hOGG1³²⁶ (Ser326Cys) encontra-se associado ao maior risco de câncer de pulmão em diversos estudos epidemiológicos (GOODE *et al.*, 2002; HUNG *et al.*, 2005). Estudos recentes demonstraram que a proteína variante hOGG1-Cys326 possui uma menor capacidade em prevenir a mutagênese induzida pela 8-oxoG, *in vivo*, em humanos, quando comparada com a proteína hOGG1-Ser326 (YAMANE *et al.* 2004).

O fato de ratos nocautes para o gene hOGG1 (Fig.04) apresentarem alta incidência de adenomas e carcinomas espontâneos reforça a hipótese da participação do produto desse gene como supressor da carcinogênese pulmonar (SAKUMI *et al.*, 2003).

Além disso a presença do polimorfismo hOGG1³²⁶ acarreta aumento significativo na frequência de fragmentos acêntricos em linfócitos de trabalhadores ocupacionalmente expostos a poeiras de metais pesados, agentes genotóxicos e carcinogênicos que atuam através da produção de ERO (MATEUCA *et al.* 2005). É também conhecida por HMMH; MUTM; OGH1; OGG1.

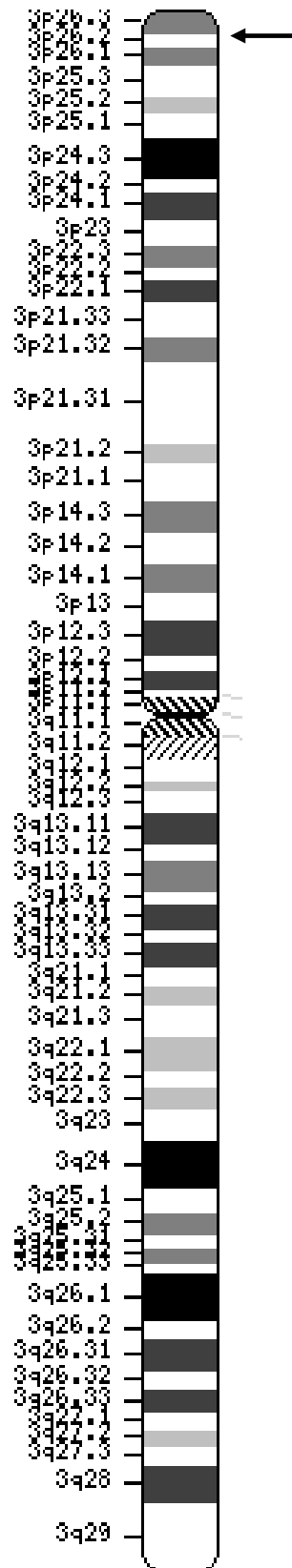


Fig 4. Gene hOGG1 ,localizado no cromossomo: 3; Posição: 3p26.2

XRCC3

O polimorfismo do gene XRCC3 do códon 241 (Fig.05) apresenta uma alteração do resíduo treonina para metionina, o qual tem sido relacionado ao maior risco de câncer de bexiga, além de ter a capacidade de afetar a função da enzima e/ou sua interação com outras proteínas envolvidas no reparo de danos no DNA (MATULLO *et al.*, 2001).

Embora não se tenha detectado associação entre o polimorfismo comum XRCC3²⁴¹ (Thr241Met) e risco para câncer de pulmão, trabalhadores que apresentavam variantes de XRCC3²⁴¹ apresentam um aumento significativo de fragmentos acêntricos quando seus linfócitos são expostos a poeiras de metais pesados, agentes genotóxicos e carcinogênicos que atuam através da produção de ERO (MATEUCA *et al.* 2005).

Além disso, trabalhadores da área médica ocupacionalmente expostos à radiação ionizante, portadores do polimorfismo XRCC3²⁴¹, possuem uma frequência aumentada de translocações recíprocas com aumento da idade, bem como um aumento da frequência de MN (ANGELINI *et al.*, 2005). Estes dados indicam a ocorrência de maior instabilidade cromossômica em indivíduos portadores desse polimorfismo. Existe uma associação positiva entre esse polimorfismo XRCC3²⁴¹ e a formação de câncer, observado em diversos estudos que inclui câncer de bexiga (MATULLO *et al.*, 2001), melanoma (WINSEY *et al.*, 2000) e câncer em pacientes com variadas radiosensibilidades (PRICE *et al.*, 1997).

Alguns estudos têm relacionado esta variante com alguns tipos de câncer, como o de mama (SMITH *et al.*, 2003), de pulmão (JACOBSEN *et al.*, 2004) e o melanoma de pele (WINSEY *et al.*, 2000). Outros estudos relacionam o polimorfismo do gene XRCC3 juntamente com o do gene XRCC1, mostrando não encontrar uma

influência significativa entre o aparecimento de câncer e esses polimorfismos (STERN *et al*, 2002).

As consequências funcionais desse polimorfismo ainda não são muito conhecidas, porém há hipóteses que esse polimorfismo pode afetar o reparo de DNA em fumantes. Este polimorfismo ocorre através da troca das bases no exon 7 do códon 241 do cromossomo 14, alterando o aminoácido tirosina para metionina.

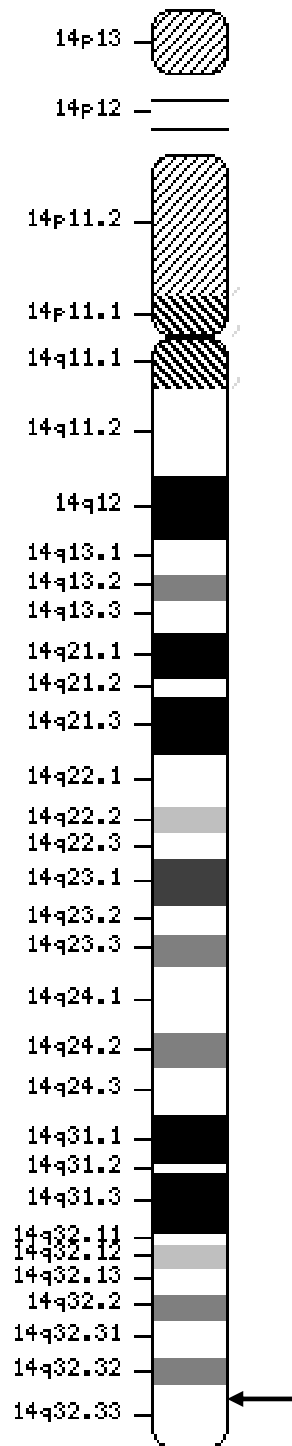


Fig. 5 Gene XRCC3, cromossomo: 14; Posição: 14q32.3

P53

O gene p53 considerado supressor de tumor localiza-se no cromossomo 17 do genoma humano (Fig.6). Mutações nesse gene podem alterar as suas propriedades e funções na via de indução de apoptose em resposta a danos no DNA e controle do ciclo celular, já que este é capaz de paralisar o ciclo na fase G1 ao detectar algum dano no material genético. FAN *et al.* (2000) demonstram que o polimorfismo p5372 (Arg72Pro) está associado à predisposição a câncer de pulmão (adenocarcinoma) em fumantes. Estudos sugeriram que esta alteração no códon 72 pode estar associada à ocorrência de câncer do estômago entre os asiáticos além de apresentarem uma distribuição genotípica associada à localização, estágio e diferenciação histológica do câncer gástrico (YONG, *et al* 2007). A combinação entre o polimorfismo p5372 e polimorfismos em genes relacionados à metabolização de xenobióticos revela um aumento significativo no risco de desenvolvimento de adenocarcinomas e carcinomas de células *squamous pulmonares* (LIU *et al.* 2001). Este polimorfismo se caracteriza pela substituição de bases no exon 4 do códon 72, envolvendo o nucleotideo G no lugar da C. É também conhecido como LFS1; TRP53; FLJ92943; TP53

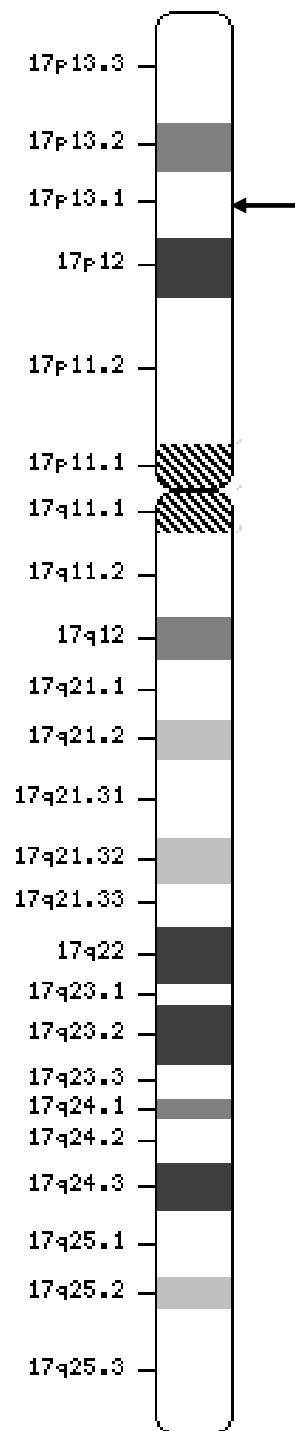


Fig. 6 Gene p53, cromossomo: 17; Posição: 17p13.1

4. METODOLOGIA:

Este projeto foi elaborado segundo as normas dispostas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz.

4.1. Área de Estudo:

Monte Alegre

O município de Monte Alegre apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 02° 00' 15"S e 54° 04' 45"W Gr (Fig.7). Possui uma população de 63.543 habitantes numa área de aproximadamente 21.703 km². (IBGE, 2008). O município de Monte Alegre pertence à mesorregião do Baixo Amazonas e à microrregião Santarém. Seus limites territoriais estão entre os municípios de limites Almeirim, a leste os municípios de Prainha, ao sul com os municípios de Prainha e Santarém e a oeste ao município de Alenquer (SEPOF-PA, 2008).



Fig 7. Mapa da Região norte abrangendo Monte Alegre e cidades próximas

4.2. Escolha dos indivíduos e coletas das amostras

De acordo com a distribuição da dose efetiva na população (estimada através dos resultados da caracterização radiológica ambiental), serão utilizados os valores dos tercis desta distribuição para comparar residentes de domicílios com maior e menor exposição à radiação. Os residentes de cada domicílio monitorado serão classificados como baixo nível de exposição (percentil 33), médio nível de exposição (percentil 34 a 66) e maior nível de exposição (acima do percentil 67). Foi considerado 1o tercil como grupo de referência (menos exposto) para comparação com o terceiro tercil (mais exposto).

Nos domicílios do 1o e 3o tercil, foram selecionados o maior número possível de residentes para a coleta de amostras, desde que atendessem aos seguintes critérios: a) ter mais de 14 anos; c) estar residindo no mesmo local por pelo menos 5 anos; d) Não ter sido exposto exames radiológicos nos últimos 3 meses. Cada participante elegível assinou um termo de consentimento para a pesquisa e respondeu a um questionário onde foram obtidas informações pessoais, tempo de residência, hábitos de fumo e, consumo de álcool, uso de medicamentos (ver anexo 2).

Para o presente estudo, foram coletadas 86 amostras de saliva contendo material genético (40 amostras de homens entre 15 e 78 anos e 46 amostras de mulheres entre 15 e 72 anos de idade). A coleta foi realizada através do Kit Oragene DNA Self-Collection Kit da DNAGenotek®. Foi realizada a coleta, preservação, transporte e purificação do DNA.

4.3. Purificação do DNA

Cada amostra de saliva contendo o material genético foi incubada por 1 hora a 50°C, para a desnaturação das proteínas. Subsequentemente foram adicionados 20µL do purificador Oragene a 500ul da amostra de saliva em um tubo Eppendorf utilizou-se

o vortex por cerca de 10 segundos para garantir a mistura da amostra com o purificador. Em seguida essa mistura foi incubada no gelo por 10 min, para melhor eliminação das impurezas. Após o esfriamento, centrifugou-se 5 minutos a 13.000 rpm x g, onde o sobrenadante foi usado enquanto que o pellet contendo impurezas foi descartado. Adicionou-se 500 µL de etanol a 95% ao tubo para a precipitação do DNA, com duração de 10 minutos para a visualização da “nuvem” de DNA. Para a finalização do processo, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 13.000 rpm e logo após foi removido o sobrenadante de cada amostra e adicionados 100 µL de água milli-Q em cada tubo de eppendorf ao pellet contendo o material de interesse para análise molecular.

4.4. Quantificação de DNA

Neste processo foi determinada a quantidade de DNA baseada na absorção de energia radiante (luz) utilizando-se o espectrofotômetro *ThermoSpectronic Genesys 10 UV*. As medições foram realizadas em 260nm, 280nm, pois no comprimento de onda de 260nm o DNA absorve luz e no de 280nm as proteínas absorvem. Para cada amostra analisada foram diluídos 10µL de DNA purificado para 90 µL de água milli-Q em uma cubeta. A concentração de DNA em ng /µL foi determinada através do cálculo $A_{260} \times 10$ (fator de diluição) x 50 (fator de conversão) (SALGUEIRO, 2002). Nesse sentido, a relação absorbância de 260nm/280nm fornece um parâmetro de qualidade do DNA, chamado de pureza. A razão entre 1,8 e 2,2 é considerada ideal. Valores inferiores a 1,8 indicam excesso de proteínas e valores superiores, excesso de solventes orgânicos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). As amostras apresentaram uma média de 1,7 para a razão de pureza, estando este valor próximo do ideal para a análise e uma média de DNA igual a 120ng/ µL, também considerada adequada, já que a quantidade ideal é em torno de 100ng/ µL (QUIAGEN, 2008).

4.5. Amplificação PCR

As reações para a amplificação foram preparadas através do kit *PCR Mastermix* da Promega[®] contendo 50 unidades por mL de Taq Dna polimerase, 400µM de: dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3mM de MgCl₂. Adicionou-se a 12,5 µL (1X) do Kit, 2,5 µL de *primer* R a concentração de 10µM e 2,5 de *primer* F também a 10 µM, mais a quantidade de DNA e H₂O de acordo com a quantidade encontrada de DNA em cada amostra, totalizando, 25 µL de reação para a amplificação. Após esse processo, cada amostra foi colocada em condições físicas específicas no total de 25 e 35 ciclos de acordo com cada gene. (Tabela 1). Os *primers* correspondentes a cada gene foram selecionados de acordo com a região de interesse onde ocorrem os polimorfismos.(Tabela2)

Tabela 1 - Condições físicas dos genes no processo de amplificação das amostras

Genes	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Ciclos
hOGG1	94 °C / 4'	94 °C/ 30''	60 °C/30''	72°C/1'30''	72 °C/5'	25
P53	95 °C/ 5'	95 °C/30''	65 °C/1'	72 °C/1'	72 °C/5'	35
XRCC3	94 °C / 4'	94 °C/ 30''	60 °C/30''	72 °C/ 30''	72 °C/5'	25

Tabela 2 - Primers específicos de cada gene para a realização do PCR

Locus	Forward Primer	Reverse Primer
p53	5`TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA	5`TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC
XRCC3	5`GCTCGCCTGGTGGTCATCGACTCG	5`AAGAGCACAGTCCAGGTCAGCTG
hOGG1	5`CCCAACCCCAGTGGATTCTCATTGC	5`GGTGCCCCATCTAGCCTTGCGGCCCTT

4.6. Polimorfismo no comprimento de fragmentos de Restrição - RFLP

O RFLP é entendido por polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA, que é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição. Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as sequências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas. A técnica baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e posterior separação, por eletroforese, dos fragmentos gerados, que correspondem a padrões de restrição específicos. Além disso, a técnica de RFLP vem sendo utilizada para rastreamento epidemiológico (NAVEDA, 2001).

Os genes de interesse foram escolhidos segundo sua importância para reparo de danos no DNA (bases oxidadas, quebras simples e duplas de DNA) resultantes da exposição às radiações ionizantes. Os fragmentos dos genes amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição específicas de cada gene. Para o gene hOGG1 utilizamos a enzima *SatI* (*Fnu4HI* – *Fermentas-Brasil*), que tem como região de corte a seguinte sequência: 5'-GC↓NGC-3'. Para o gene p53 a enzima *Bsh1236I* (*BstUI*-*Fermentas-Brasil*) com a sequência para corte 5'-CGC↓G-3' e a enzima *Hin1I* (*Hsp92II*-*Fermentas-Brasil*) para o gene XRCC3 cortando em 5`CATG↓3`. Cada enzima de restrição é específica para cada região de corte dos genes estudados (Tabela 3). Os tamanhos diferentes dos fragmentos determinam o genótipo do indivíduo (Tabela 4)

Tabela 3 - Genes e suas enzimas de restrições correspondentes

Gene alvo	Tipo de polimorfismo	Enzima utilizada
p53	Arg72Pro	(BstUI)
XRCC3	Thr241Met	(Hsp92II)
hOGG1	Ser326Cys	(Fnu4HI)

Tabela 4 - Tamanho dos fragmentos de interesse após o corte com cada enzima de restrição

Genes alvos	RFLP	Genótipo
p53	199bp	Pro-Pro
	113bp, 86bp▼	Arg-Arg
	199, 113 e 86bp	Arg-Pro
XRCC3	335bp	Thr-Thr
	233, 102bp	Met-Met
	335, 233 e 102bp	Thr-Met
hOGG1	213bp	Ser-Ser
	164 e 49bp	Cys-Cys
	213, 164 e 49bp	Ser-Cys

4.7 – Análise estatística dos polimorfismos encontrados

Foi realizada a análise da frequência dos polimorfismos na população por sexo, categorias de idade (<40 e >=40), exposição à radiação (1^o e 3^o tercís de exposição), fumo, doenças, área de moradia (rural e urbana). O teste de *Fisher foi utilizado para comparar as frequências com um nível de significância de 0,05*. Esse teste foi realizado através do programa estatístico STATA/ SE 8.0 para Windows

4.8 – Inquérito epidemiológico realizado na população de Monte Alegre

Um inquérito de morbidade foi realizado no âmbito do projeto Fiocruz-IRD em cada um dos domicílios selecionados. As informações foram coletadas em

questionários validados aplicados por entrevistadores, sendo respondidos diretamente pelos participantes com idade igual ou maior que 15 anos, ou pelos responsáveis pelos menores com idade aquém daquele ponto de corte. O inquérito teve a finalidade de descrever o perfil de morbidade referida e o padrão de uso de serviços de saúde.(Melo, 2009). Mais detalhes dessa metodologia pode ser vista no anexo 2.

5 - Resultados

5.1 – Qualidade das amostras

A quantidade e a pureza do DNA genômico obtido foram satisfatórias para a realização do PCR e análise por RFLP. Foram encontradas em mais de 90% das amostras razões (260nm/280nm) acima de 1,6. A média das leituras das absorbâncias 260/280 ficou em torno de 1,75. A concentração de DNA obtido do material extraído com o Kit Oragene apresentou rendimento médio de 120ng/μL.

O número de amostras com qualidade de extração de material genético, e com condições para o corte de enzima de restrição foi de 67 indivíduos, que representa cerca 80% de rendimento das amostras recolhidas da população de Monte Alegre.

5.2 – Analise da freqüências dos alelos

A freqüência dos alelos polimórficos foi calculada neste trabalho e constatou-se que a maior freqüência foi encontrada no alelo polimórfico do gene p53 no resíduo Pro do códon 72 com 40,8% e a menor freqüência no gene hOGG1 com 5 % de freqüência no resíduo Cys do códon 326. Pode-se observar a distribuição dos alelos de acordo com a tabela 8 a seguir.

Tabela 5 - Frequência nos alelos polimórficos dos genes de estudo

Genes	Alelo Polimórfico	
hOGG1	Ser326Cys	5%
XRCC3	Thr241Met	20,5%
p53	Arg72Pro	40,8%

5.3. Análises das Frequências genotípicas

As análises das frequências observadas foram realizadas para a verificação do número de indivíduos polimórficos na região, sendo esta, uma análise comum para a determinação do genótipo e fenótipo de uma população. Foram realizadas três análises distintas de frequências genotípicas: Frequência genotípica de acordo com sexo e idade; Frequência genotípica de acordo com grupos populacionais expostos aos fatores de riscos externo para câncer e da frequência genotípica por doenças na população.

5.3.1 – Frequência genotípica de acordo com sexo e idade

A primeira análise realizada foi o levantamento da frequência genotípica dos indivíduos de acordo com o sexo e a idade. Ao ser encontrado polimorfismo em um alelo, o grupo foi classificado como heterozigotos (Hetero) e quando há polimorfismo nos dois alelos, homozigotos (Homo VAR) e quando não foi encontrado polimorfismo em nenhum dos dois alelos, denominados de homozigoto selvagem (Homo WT). A tabela 5 apresenta a frequência genotípica entre os sexos (masculino e feminino) e idade (<40 e ≥40). Os resultados mostram que a frequência genotípica não difere entre os sexos nem entre as categorias de idade para cada gene estudado: hOGG1, XRCC3, p53 (p-valor = 0.400, 0,610, 0,570, respectivamente).

Tabela 6 – Frequências genotípicas para os três genes em relação ao sexo e a idade dos indivíduos estudados

Variável	Categoria	Frequência genotípica (%)			P-valor	
		Homo-WT	Hetero	Homo-VAR		
		hOGG1				
Sexo	Masculino	84,6	11,5	3,9	0,40	
	Feminino	95,0	2,5	2,5		
			XRCC3			
	Masculino	88,5	11,5	-	0,61	
	Feminino	87,5	12,5	-		
			p53			
Masculino	65,4	15,4	19,2	0,57		
Feminino	55,0	27,5	17,5			
		hOGG1				
Idade	<40	88,6	5,7	5,7	0,55	
	≥40	93,7	6,3	-		
			XRCC3			
	<40	88,6	11,4	-	0,59	
	≥40	87,5	12,5	-		
			p53			
<40	48,6	31,4	20,0	0,12		
≥40	71,9	12,5	15,6			

5.3.2 – Frequência genotípica entre grupos populacionais expostos a fatores de riscos externo para câncer

Nesta análise, avaliou-se frequência genotípica entre grupos populacionais que estariam expostos a outros fatores externos de riscos para câncer, como por exemplo a exposição à radiação e o fumo. Desta forma, poder-se-ia sugerir uma maior vigilância epidemiológica nos grupos que apresentassem maior frequência de polimorfismos em situações de maior risco (mais exposto e/ou fumantes) que conseqüentemente estariam mais suscetíveis ao desenvolvimento de um câncer.

A tabela 6 apresenta o resultado da distribuição das frequências genotípicas entre os indivíduos mais expostos (terceiro tercil da distribuição de dose) e menos expostos a radiação (primeiro tercil da distribuição de dose) e entre os indivíduos fumantes e não fumantes. Observa-se que para os fumantes com polimorfismo em hOGG1 apresentam o p-valor igual a 0.031 o que é estatisticamente relevante.

Tabela 7 - Frequências genotípicas para os três genes em relação ao tercil específico e o fumo dos indivíduos estudados

Variável	Categoria	Frequência genotípica (%)			P-valor
		Homo-WT	Hetero	Homo-VAR	
Níveis de exposição a radiação		hOGG1			
	Menos expostos (Tercil 1)	97%	-	3%	0.08
	Mais expostos (Tercil 3)	84,8%	12,1%	3%	
		XRCC3			
	Menos expostos (Tercil 1)	94%	6%	-	0.15
	Mais expostos (Tercil 3)	82%	18%	-	
	p53				
Menos expostos (Tercil 1)	59,7%	22,4%	17,9%	0.88	
Mais expostos (Tercil 3)	61%	15%	24%		
Fumo		hOGG1			
	Sim	70.00%	30.00%	-	0.03
	Não	93.00%	3,5%	3,5%	
		XRCC3			
	Sim	70.00%	30.00%	-	0.10
	Não	91.00%	9.00%	-	
	p53				
Sim	70.00%	10.00%	20.00%	0.40	
Não	59,7%	22,8%	17,5%		

5.3.3 – Frequência genotípica entre indivíduos que apresentam doenças crônicas

Com base no inquérito realizado na população, a frequência de polimorfismos foi avaliada para algumas doenças, como a artrite reumatóide e hepatite. Nenhum caso de câncer foi reportado no inquérito, logo não foi incluído na análise. A frequência encontrada de polimorfismo não foi estatisticamente relevante entre os portadores de reumatismo nem de hepatite (Tabela 7).

Tabela 8 – Frequência genotípica dos indivíduos e doenças associadas

Doença	Categoria	Frequência genotípica (%)			P-valor
		Homo-WT	Hetero	Homo-VAR	
Artrite	hOGG1				
	Sim	20	1	0	0.52
	Não	27	3	3	
	XRCC3				
	Sim	17	4	-	0.27
	Não	29	3	-	
	p53				
	Sim	12	4	5	0.44
	Não	18	10	4	
Hepatite	hOGG1				
	Sim	3	4	2	1.0
	Não	45	-	-	
	XRCC3				
	Sim	3	-	-	0.65
	Não	44	7	-	
	p53				
	Sim	1	1	1	0.57
	Não	29	14	8	

5.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg estabelece que em uma população infinitamente grande, onde os cruzamentos ocorrem ao acaso e sobre o qual não há atuação de fatores evolutivos, as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes ao longo das gerações. O cálculo foi realizado para averiguar a frequência dos genótipos dos indivíduos da região de estudo, além do valor dos alelos selvagens e polimórficos.

Através de fórmulas estatísticas foram calculadas as frequências esperadas dos genótipos e foram comparadas com as frequências observadas (Tabela 9) e após este cálculo encontrou-se um valor do qui-quadrado, em um intervalo de confiança de 95%. Com as frequências genotípicas foi possível encontrar os alelos “p” e “q” (Tabela 10), onde “p” é o valor da frequência encontrada no alelo não polimórfico e o “q” o valor do alelo polimórfico. O n de cada amostra foi calculado através da fórmula $n = 4pq/e^2$, em uma curva normal onde $z=2$, e “e” é a incerteza de medição.

O n mínimo para os genes h OGG1 e XRCC3 foi de 23 indivíduos e para o gene p53, 62 indivíduos. O n amostral do estudo em questão foi de 67 indivíduos, logo este encontra-se dentro do intervalo de confiança, com uma incerteza de 10 e 11,5% respectivamente.

Esta análise demonstrou que os genes hOGG1 e p53 não se estava em equilíbrio de Hardy-Weingerg, já o gene XRCC3 apresentou equilíbrio. Por isso podemos sugerir que os fatores evolutivos não interferiram na frequência deste gene diferentemente dos dois genes anteriores. Alguns fatores como mutação ao acaso, casamentos consanguíneos, além do fato da população ser relativamente pequena, podem ter interferido na frequência gênica dessa região.

Tabela 9 – Valores das frequências observadas e esperadas

	h OGG1	XRCC3	p53
Observado			
p2	88,6%	88,6%	50,1%
2pq	11%	11%	41%
q2	0,4%	0,4%	0,9%
Esperado			
p2	58,4%	59,3%	33,7%
2pq	7,4%	7,6%	27,7%
q2	0,2%	0,3%	5,6%

Tabela 10 - Valor dos alelos p e q para os genes estudados

	hogg1	XRCC3	p53
p	0,94	0,94	0,71
q	0,06	0,06	0,30

6. Discussão

Os níveis de radiatividade natural em Monte Alegre são compatíveis com os níveis de exposição à radiação encontrados em outras cidades brasileiras, onde não espera-se encontrar efeitos adversos à saúde associados a exposição à radiação ionizante.

Uma possível hipótese para uma maior incidência de câncer em Monte Alegre estaria relacionada a presença de indivíduos com maior susceptibilidade genética à radiação ou predisposição familiar ao desenvolvimento do câncer, muito embora, a taxa de mortalidade por câncer em Monte Alegre não é maior que a esperada para o estado do Pará, onde a população de estudo está localizada (Melo, 2009).

Uma frequência dos indivíduos com o alelo para polimorfismo (Ser326Cys) no gene hOGG1 foi de 5%, já para o alelo polimórfico do gene XRCC3 (Thr241Met) foi de 20,5%; e a frequência do alelo polimórfico (Arg72Pro) do gene p53 foi de 40,8%. A frequência destes polimorfismos nos três genes são compatíveis com as frequências reportadas na literatura para outras populações.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos polimorfismos nos genes estudados por sexo nem categorias de idade (< 40 anos e > 40 anos).

Em relação aos níveis de exposição a radiação natural, não houve diferença entre os indivíduos do 1^o tercil e do 3^o tercil para os genes XRCC3 (p-valor=0.15) e p53 (p-valor=0.88) e hOGG1 (p-valor=0.08).

Não foi encontrada diferença significativa na frequência de polimorfismo entre fumantes e não fumantes para os genes p53 e XRCC3. No entanto, foi observada uma maior frequência de polimorfismo no gene hOGG1 entre os fumantes (p-valor

igual a 0.03). Uma vez que a maior frequência de polimorfismos em genes relacionados a estabilidade genômica podem conferir uma maior susceptibilidade ao câncer quando expostos a agentes carcinógenos, estes indivíduos fumantes estão em maior risco de desenvolvimento da doença e devem fazer parte de um programa de vigilância epidemiológica e deixarem de fumar.

Além dessas análises uma outra abordagem foi feita em relação as frequências genóticas dos indivíduos que apresentavam doenças crônicas baseado no inquérito de morbidade. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos polimorfismos dos genes em estudo entre os portadores e não portadores de hepatite (p-valor=1, 0.65, 0.57 para hOGG1, XRCC3 e p53 respectivamente) e artrite reumatóide (0.52, 0.27 e 0.44 para hOGG1, XRCC3 e p53, respectivamente).

A frequência genotípica para os genes hOGG1 e p53 se encontrou em desequilíbrio, de acordo com o teorema de Hardy Weinberg. Este fato pode ser atribuído ao tamanho da população local ser pequeno, a taxa de mutação local ser elevada, ou ainda a ocorrência de casamentos consanguíneos.

A frequência genotípica dos genes p53 e hOGG1 analisados obtiveram suas frequências semelhantes com o encontrado em estudos anteriores. (GOODE, 2002. FAN *et al*, 2000).

Estudos que consideraram o histórico de fumo dos participantes sugerem que o risco de câncer associado ao genótipo variante (Thr241Met) no XRCC3 é maior entre fumantes do que entre não-fumantes (JACOBSEN *et al.*,2006).

Essa correlação é importante para o presente estudo já que não foram encontrados genótipos homocigotos variantes 241Met/Met do gene XRCC3 na população de Monte Alegre. Os fumantes ativos correspondem a mais de 10% da população e 58% dos ex-fumantes fumaram por 10 anos ou mais (SOMBRA, 2009).

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).

As SNPs em regiões intrônicas dificilmente apresentam um papel funcional direto, porém estes podem afetar o *splicing* do RNA e, conseqüentemente, a transição de um gene. Alguns estudos avaliaram a associação da variação da base A para G na região intrônica (intron 6) do gene XRCC3 (Thr241Met) com o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (PAGANI & BARALLE, 2004). JIAO et al em 2008 realizou um estudo que não indicou nenhuma evidencia de associação entre o polimorfismo 241Met e o risco de câncer pancreático.

A radiação natural em Monte Alegre pode ser considerada como um efeito indutor de quebras de fita de DNA, por isso foi realizada a análise da correlação da presença dos diversos polimorfismos estudados nos genes XRCC3, p53 e hOGG1 na susceptibilidade genotóxica dos indivíduos expostos a radiação natural em Monte Alegre.

A influência desses polimorfismos, os quais estão envolvidos no reparo do DNA e na genotoxicidade induzida por radiação, depende da dose de exposição.

Os resultados deste trabalho mostram que não existe uma maior frequência de polimorfismos nos genes estudados na população de Monte Alegre. Logo, não justificaria uma maior susceptibilidade genética para desenvolvimento de câncer devido a presença destes polimorfismos relacionados a manutenção da estabilidade genômica.

7. Conclusão

Os resultados encontrados na população de Monte Alegre no estado do Pará demonstraram que a frequência de polimorfismo nos genes p53, XRCC3 e hOGG1 foi semelhante ao esperado em uma população qualquer. A frequência de polimorfismo nos genes de estudo não difere por sexo, faixa etária, níveis de exposição à radiação e nem em indivíduos portadores de hepatite e artrite reumatóide.

A frequência de polimorfismos no gene hOGG1 difere significativamente entre fumantes e não fumantes, apresentando uma maior frequência dos alelos polimórficos entre os indivíduos fumantes. Desta forma, sugere-se que indivíduos fumantes portadores de uma maior frequência de polimorfismos no gene hOGG1 parem de fumar e estejam sob maior vigilância epidemiológica, pois podem apresentar uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de câncer.

8. Referências bibliográficas

ALBRECHTSEN N, DORNREITER I, GROSSE F, KIM E, WIESMÜLLER L, DEPPERT W., 1999 “ Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53”. *Oncogene*, 18 7706 – 7716.

ANGELINI, S., KUMAR, R., CARBONE F., MAFFEI, F., FORTI, G.C., VIOLANTE, F.S., LODI, V., CURTI, S., HEMMINKI, K and HRELIA, P., 2005 “Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes.” *Mutation Research* 570:105-117.

ANTONELLI , F, , M. BELLI, A. CAMPA, A. CHATTERJEE, V. DIN G. ESPOSIT, B. RYDBERG, G. SIMONE AND M. A. TABOCCHINI, 2002 “DNA fragmentation induced by Fe ions in human cells: shielding influence on spatially correlated damage”

BERWICK M AND VINEIS P, 2000 “Markers of DNA repair and susceptibility in humans: an epidemiological review.” *J Na Câncer Inst* 91: 874-897.

BLAND KI, COPELAND III EM, 2004 “The breast: comprehensive management of benign and malignant disorders” 3rd. ed. St. Louis: Elsevier, 2004, 1628p

BOICE JOHN D, JR, DSC, 2006 “RESPONSE: Re: Risk of Thyroid Cancer After Exposure to ¹³¹I in Childhood” *JNCI* 98(9):642

BOITEAUX, S. AND RADICELLA, J.P., 2000 “The human OGG1 gene: structure, functions and its implication in the process of carcinogenesis.” *Arch. Biochem. Biophys.* 377:1-8.

BOITEUX, S.; GAJEWSKI, E.; LAVAL, J.; DIZDAROGLU, M., 1992 “ Substrate Specificity of The *Escherichia coli* FPG protein (Formamidopyrimidine-DNA glycosilase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization.” *Biochemistry*, Washington, v. 31, p. 106-111.

BÔER, J. G. 2002 “ Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions.” *Mutation Research* 509: 202-210.

BOSARI, S. G VIALE, M RONCALLI, D GRAZIANI, G BORSANI, AK LEE AND G COGGI, 2008 “p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma” *American Journal of Pathology*, Vol 147, 790-798

CALDECOTT KEITH W, 2008. “Single-strand break repair and genetic disease.” *Nature Reviews Genetics* (9), 619-631.

CESAR, C.L.G., CARANDINA, L., ALVES, M.C.G.P, BARROS, M.B.A, GOLDBAUM, M., 2005. “Saúde e condição de vida em São Paulo. Inquérito multicêntrico de saúde no Estado de São Paulo.” Faculdade de Saúde Pública da USP. 212p.

CHEN Z., ELIZABETH A. ODSTRCIL, BENJAMIN P. TU, STEVEN L. MCKNIGHT, 2007 “Restriction of DNA Replication to the Reductive Phase of the Metabolic Cycle Protects Genome Integrity” *Science* 316 (5833): 1916-1919

CHRISTMANN, M., TOMICIC, M., ROOS, W.P. AND KAINA, B., 2003 “Mechanism of human DNA repair genes: an update.” *Toxicology* 193:3-34.

DRISCOLL, V MARK O' AND PENNY A. JEGGO ,2006 “The role of double-strand break repair insights from human genetics.” *Nature Reviews Genetics* (7), 45-54.

DOETSCH, P. W. & CUNNINGHAM, R. P.,1990, "The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutat Res.* 1990 Sep–Nov;236(2-3):173–201.

FAN, R., WU, M-T., MILLER, D., WAIN, J.C., KELSEY, K.T., WIENCKE, J.K. AND CHRISTIANI, D.C. 2000 "The p53 codon 72 polymorphism and lung câncer risk." *Câncer Epidemiology, Biomarker & Prevention* 9:1037-1042.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p

FORD, B.N., RUTTAN, C.C., KYLE, V.L., BRACKLEY, M.E. AND GLICKMAN, B.W. 2002 " Identification of single nucleotide polymorphism in human DNA repair genes." *Carcinogenesis* 21(11):1977-1981.

FRIEDBERG, E. C., WALKER, G. C., AND SIEDE, W. (eds.).1995, "DNA Repair and Mutagenesis." *Washington: ASM Press.*

GENE TEST: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1993-2010. Available at <http://www.genetests.org>. Date of access: 10/2009.

GOODE, E.L., ULRICH, C.M. AND POTTER, J.D. 2002 " Polymorphisms in DNA repair genes and associations with câncer." *Câncer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11:1513-1530.

GRIVICICH, IVANA REGNER, ANDRÉA BRONDANI DA ROCHA , ADRIANA, 2007 "Apoptosis: Programmed Cell Death" *Revista Brasileira de Cancerologia* 53(3): 335-343.

HADA M, GEORGAKILAS AG., 2008 “Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review” *J Radiat Res (Tokyo)*. 49(3):203-10

HARMS, C., SALAMA, S.A., SIERRA-TORRES, C.H., CAJÁS-SALAZAR, N. AND AU, 2004. “ Polymorphisms in DNA repair genes, chromossome aberratoins and lung câncer.” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44(1):74-78

HOEIJMAKERS, J.H.J. 2001, “Genome maintenance mechanisms for preventing câncer.” *Nature* 411: 366-374.

HUNG, R.J., BRENNAN, P., CANZIAN, F., SZESZENIA-DABROWSKA, N.,ZARIDZE, D., LISSOWSKA, J., RUDNAI, P., FABIANOVA, E.,MATES, D., FORETOVA, L., JANOUT, V. 2005 “ Large-Scale Investigation of Base Excision Repair Genetic Polymorphisms and Lung Câncer Risk in a Multicenter Study.” *Journal of National Câncer Institute* 97(8):567-576.

KHANNA ,K.K. & JACKSON,S.P., 2001 “DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection”. *Nature Genetics* 27, 247–254

KISH, L., 1965. *Survey sampling*.” Editora: Wiley. 664. 1ªed .

IBGE, “Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais”. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Seminário Nacional com as Instituições Responsáveis por limites Político-Administrativos. Brasília - DF, 1º de Julho de 2008.

ICRP, 1993 – “Radon in buildings.” *Annals of the ICRP*, Volume 23, Issue 2, Pages 13-15.

IMPROTA, GIUSEPPINA, ALESSANDRO SGAMBATO, GABRIELLA BIANCHINO, ANGELA ZUPA, VITINA GRIECO, GIUSEPPE LA TORRE, ANTONIO TRAFICANTE and ACHILLE CITTADINI, 2008 “Polymorphisms of the DNA Repair Genes *XRCC1* and *XRCC3* and Risk of Lung and Colorectal Câncer: A Case-Control Study in a Southern Italian Population”. *Anticâncer Research* 28: 2941-2946 .

JACOBSEN NR, RAASCHOU-NIELSEN O, NEXØ B, WALLIN H, OVERVAD K, TJØNNELAND A, VOGEL U, 2004. “ *XRCC3* polymorphisms and risk of lung cancer.” *Cancer Lett*, 213:67-72.

JIAO LI, PH.D., MANAL M. HASSAN, PH.D., MELISSA L. BONDY, PH.D., ROBERT A. WOLFF, M.D., DOUGLAS B. EVANS, M.D., JAMES L. ABBRUZZESE, M.D., AND DONGHUI LI, PH.D.” *XRCC2* and *XRCC3* Gene Polymorphism and Risk of Pancreatic Cancer” *Am J Gastroenterol*. 2008 February; 103(2): 360–367.

KREWSKI D, LUBIN JH, ZIELINSKI JM, ALAVANJA M, CATALAN VS, WILLIAM FR. 2005 “Residential Radon and Risk of Lung Câncer: a Combined Analysis of 7 North American Case-Control Studies. *Epidemiology*. 16(2):137-45.

LIMA, W.C.; MEDINA-SILVA, R.; GALHARDO, R.S. and MENCK, C.F.M.. 2001 “Distribution of DNA repair-related ESTs in sugarcane.” *Genet. Mol. Biol.* vol.24, n.1-4, pp. 141-146. ISSN 1415-4757

LEWIN, BLYNNE CASSIMERIS , VISHWANATH R. LINGAPPA, 1997, *Cells*. 2^a ed.

LITTLE JB. Ionizing Radiation. In: Kufe DF, Pollock RE, Weischelbaum RR, et al., eds. *Cancer Medicine e.6*. Hamilton, London: B.C. Decker, Inc. 2003: 289-302.

LIU, G., MILLER, D.P., ZHOU, W., THURSTON, S.W., FAN, R., XU, L-L, LYNCH, T.J., WAIN, J.C., SU, L. AND CHRISTIANI, D.C., 2001 “Differential association of the codon 72 p53 and GSTM1 polymorphism on histological subtype of non-small cell lung carcinoma.” *Câncer Research* 61:8718-8722.

MATEUCA, R., AKA, P.V., DE BOECK, M., HAUSPIE, R., KIRSCH-VOLDERS, M. AND LISON, D., 2005 “ Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicology Letters* 156:277-288.

MATULLO, S. GUARRERA, S. CARTURAN, M. PELUSO, C. MALAVEILLE, L. DAVICO, A. PIAZZA AND P. VINEIS, 2001 “DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder câncer in a case-control study” *Int. J. Câncer* 92 , pp. 562–567.

Melo, VP. Avaliação da concentração do Rn₂₂₂ nos ambientes internos e externos das residências do município de Monte Alegre, PA [Tese de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1999.

MELO, L R , 2009 “Mortality and cancer incidence among residents in an area with a geological occurrence of uranium: the municipality of Monte Alegre, PA, Brazil.” Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciênciasna área de Saúde Pública e Meio Ambiente.

NAVEDA, L. A. B. ; MOREIRA, E. C.; VELOSO, I. F.; ZANINI, M. S, 2001
“Padronização da técnica de RFLP para estudos em epidemiologia molecular.”

NRC. National Research Council.1988 “Committee on the Biological Effects of
Ionizing Radiations. Health Risks of Radon and other Internally Deposited
Alpha-Emitters. BEIR IV- Whashington, D.C.: National Academy Press. p. 602.

PAGANI F, BARALLE FE., 2004 “Genomic variants in exons and introns:
Identifying the splicing spoilers.” *Nat Rev Genet.*;5:389–96.

PASTANA, 1999. Informações para gestão territorial – Gate Programa de
integração mineral em municípios da Amazônia – Primaz – Síntese Geológica e
Favorabilidades para tipos de Jazimentos Minerais.

OLIVEIRA, MELLO S.S.M FACHIN, AL., HOJO E.T.S, 2006 “Respostas
celulares ao antitumoral VP16 (ETOPOSIDE), avaliadas pela análise de
expressão gênica (reparo do dna), cinética do ciclo celular e trocas entre
cromátides irmãs.” Resumo publicado.

PEREIRA, E.R.1988, “ Possibilidades metalogenéticas na região do Domo de
Monte Alegre-PA.” In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOLOGIA, 35, Belém,
1988.v.1 p.286-300.

PRICE E.A., S.L. BOURNE, R. RADBOURNE, P.A. LAWTON, J. LAMERDIN,
L.H. THOMPSON AND J.E. ARRAND, 1997 “Rare microsatellite
polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5
associated with câncer in patients of varying radiosensitivity, *Somat Cell Mol.
Genet.* V.23, N.4 pp. 237–247.

QUIAGEN 2008 “Archive-quality DNA purified from human whole blood using the Gentra Puregene Blood Kit”. *Protocol*

ROOSEVELT AC, LIMA DA COSTA M, LOPES MACHADO C, MICHAB M, MERCIER N, VALLADAS H, FEATHERS J, BARNETT W, IMAZIO DA SILVEIRA M, HENDERSON A, SLIVA J, CHERNOFF B, REESE DS, HOLMAN JA, TOTTH N, SCHICK K. 1996 “Paleoindian Cave Dwellers in the Amazon: The Peopling of the Americas. *Science* ; 272: 373-384

RUTTAN, C.C. AND GLICKMAN, B.W. 2002 “Coding variants in human double-strand break DNA repair genes.” *Mutation Research* 509: 175-200.

SACHET, I., 2002 “Caracterização da radiação gama ambiental em áreas urbanas utilizando uma unidade móvel de rastreamento.” PhD Thesis. Instituto de Biociências Nucleares - Universidade Estadual do Rio de Janeiro..

SACHET, I., 2000 – Tese de doutorado. Universidade Estadual do Rio de Janeiro (em conclusão)

SALGUEIRO, NATÁLIA BOAVENTURA, 2002 “Identificação de Mutações no Gene da Dthidropirimidina Desidrogenase em Doentes com Carcinoma Colo-Rectal Implicações no Tratamento Com 5-Fluorouracil”. Dissertação de Mestrado.Porto 2002.

SAKUMI, K., TOMINAGA, Y., FURUICHI, M., XU, P., TSUZUKI, T., SEKIGUSHI, M. 2003 “ Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption.” *Câncer Research* 63:902-905 .

SEPOF PA, 2008. Secretaria de Estado de Planejamento,orçamento e finanças. Estatística Municipal de Monte Alegre.

STEINUM, A.L. & E. SEEBERG 1986. "Nucleotide sequence of the tag gene from *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res.* 14:3763-3772

STERN, MARIANA C. DAVID M. UMBACH, RUTH M. LUNN, AND JACK A. TAYLOR , 2002 "DNA Repair Gene *XRCC3* Codon 241 Polymorphism, Its Interaction with Smoking and *XRCC1* Polymorphisms, and Bladder Câncer Risk. *Câncer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* vol. 11, 939–2002

SHINMURA, K & YOKOTA J, 2001 "The *OGG1* Gene Encodes a Repair Enzyme for Oxidatively Damaged DNA and Is Involved in Human Carcinogenesis" *Antioxidants & Redox Signaling* 3(4): 597-609

SMITH TR, MILLER MS, LOHMAN K, LANGE EM, CASE LD, MOHRENWEISER HW, HU JJ, 2003. "Polymorphisms of *XRCC1* and *XRCC3* genes and susceptibility to breast cancer." *Cancer Lett*, 190:183-190.

SOMBRA, C.ML. , 2009 "Biomonitoramento genotóxico e genético como indicador de risco à saúde por exposição ao urânio de residentes dos municípios de Monte Alegre, Prainha e Alenquer no estado do Pará." Dissertação de Mestrado. UFC/Farmacologia

THACKER, J. 2005 "The *RAD51* gene family, genetic instability and câncer." *Câncer Letters* 219: 125-135.

UNSCEAR, 2006 "Effects of ionizing radiation United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation" Report to the General Assembly. Report, Volume 1 - Report to the General Assembly, with Scientific Annexes A and B.

VEIGA, LH , KOIFMAN S, MELO VP, SACHET I, AMARAL EC. 2003
“Preliminary indoor radon risk assessment at the Poços de Caldas Plateau,
MG-Brazil.” *Journal of Environmental Radioactivity*, Volume 70, Issue 3, Pages
161-176

VODICKA, P., KUMAR, R., STETINA, R., SANYAL, S., SOUCEK, P.,
HAUFROID, V. 2004 “Genetic polymorphisms in DNA repair genes and
possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-
strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* Vol. 25, No. 5, 757-763.

WINSEY, N.A. HALDAR, H.P. MARSH, M. BUNCE, S.E. MARSHALL, A.L.
HARRIS, F. WOJNAROWSKA AND K.I. WELSH, 2000 “A variant within the
DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin
cancer” *Cancer Res.* 60

YAMANE, A., KOHNO, T., ITO, K., SUNAGA, N., AOKI, K., YOSHIMURA, K.,
MURAKAMI, H., NOJIMA, Y., YOKOTA, J., 2004 Differential ability of
polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-
hydroxyguanine in human cell *in vivo Carcinogenesis*, 25, 1689–1694.

YONG ZHOU , NI LI WEN ZHUANG GUAN-JIAN LIU , TAI-XIANG WU , XUN
YAO , LIANG DU , MAO-LING WEI , XIAO-TING WU, 2007 “P53 codon 72
polymorphism and gastric cancer: A meta-analysis of the literature” *Cancer
Genetics*

ZIENOLDDINY S, CAMPA D, LIND H, RYBERG D, SKAUG V STANGELAND L, PHILLIPS DH, CANZIAN F AND HAUGEN A , 2006 "Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung câncer. *Carcinogenesis* 27: 560-567.

ANEXO 1 - Quadro 1- Dados dos indivíduos analisado

Nºcoleta	iniciais nome	IDADE	SEXO	TERCIL	hOGG1	XRCC3	P53
2	ACM	53	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
3	LSM	18	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
4	MJSS	22	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
5	MNC	24	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
8	SCL	78	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
10	AOL	15	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
11	GCN	31	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
12	ASS	18	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
13	SFM	34	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
14	RLS	26	F	1	Homozig. Wt	Hetero	Homozig. Wt
15	FMC	68	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
16	JPM	17	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
18	MBS	27	F	3	Homozig. Wt	Hetero	Homozig. Wt
19	MRAM	33	F	1	Homozig. VAR	Hetero	Homozig. Wt
22	CSS	25	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
23	FSS	63	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
24	JTS	73	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
25	MLCB	59	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
26	MCP	86	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
27	MPCB	51	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
28	JSC	18	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
29	LMNA	36	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
30	RBS	35	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
33	RVS	56	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
36	AJSS	24	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
37	LS	35	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
38	ENC	22	F	3	Homozig. Wt	Hetero	Homozig. Wt
39	JAC	68	M	3	Homozig. Wt	Hetero	Homozig. Wt
41	GNC		M	3	Homozig. Wt	Hetero	Homozig. Wt
42	MCSS	52	F	3	Homozig. Wt	Hetero	Homozig. Wt
43	RNS	62	M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
44	RFS	31	M	3	Hetero	Homozig. Wt	Homozig. Wt
45	MLSA	55	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
46	JCA	37	M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
47	REAS	34	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
48	JCAO	15	M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
49	FJMS	53	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
50	DAC	51	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
50	OAC	51	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
52	AJCC	21	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
53	VAM	24	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
54	JACS	25	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
55	IPM	37	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR

Nºcoleta	iniciais	IDADE	SEXO	TERCIL	hOGG1	XRCC3	P53
57	RSS	47	F	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
58	JMS	52	M	1	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
72	MASA	62	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
74	JLP	62	M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
75	MSP	53	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
76	CRA	36	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
77	MCD	42	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
78	LD	22	M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
79	FMOS	40	M	3	Homozig. Wt	Hetero	Homozig. Wt
80	NMS	72	M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
81	ECS	44	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
82	MSN	36	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
87	MAS	15	M	3	Hetero	Homozig. Wt	Homozig. Wt
88	ALA	23	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
90	COM	63	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
91	CBS		M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
92	IBC	67	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Hetero
93	FBO		M	3	Hetero	Homozig. Wt	Homozig. Wt
94	RSR	52	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. Wt
95	RRL	15	F	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR
100	RSC	24	M	3	Homozig. VAR	Homozig. Wt	Hetero
102	LML	53	F	3	Hetero	Homozig. Wt	Hetero
103	WLA	17	M	3	Homozig. Wt	Homozig. Wt	Homozig. VAR

ANEXO 2

Metodologia de campo aplicada no projeto Fiocruz-IRD: Avaliação epidemiológica e caracterização radiológica ambiental na população residente dos municípios de Monte Alegre, Alenquer e Prainha-PA

1- Processo de amostragem dos domicílios para a monitoração radiológica e dos participantes no inquérito de morbidade

O método de amostragem das residências foi probabilística estratificada por conglomerados em dois estágios: setor censitário e domicílio (Kish, 1965). As unidades primárias de amostragem foram sorteadas com probabilidade proporcional ao tamanho, expresso pelo número de domicílios da contagem populacional do IBGE. A população de estudo foi constituída pelos residentes em área urbana e rural em domicílios nos municípios de Monte Alegre utilizando a metodologia proposta por Porto Alves (2005).

Para alcançar o objetivo do estudo em relação a determinação de estimativas das sub-populações segundo sexo e idade, foram analisados os seguintes estratos: população menor 1ano; população de 1 a 11 anos; homens de 12 a 19 anos; mulheres de 12 a 19 anos, homens de 20 a 59 anos; mulheres de 20 a 59 anos; homens de 60 anos ou mais; mulheres de 60 anos ou mais. A escolha destes estratos permitiu a realização de comparações com estudos realizados anteriormente em outros municípios do país (Cesar *et al*, 2005).

A determinação do tamanho da amostra dos indivíduos estudados foi obtida utilizando a expressão:

$$n_0 = [P \cdot (1-P) / (d/z)^2] \cdot eff$$

onde,

n_0 = número de indivíduos (tamanho da amostra)

P é a proporção de indivíduos estimada;

z é o valor na curva de Gauss correspondente ao nível de confiança empregado na determinação do intervalo de confiança;

d constitui o erro de amostragem aceito

eff é o efeito de delineamento (Kish, 1965, Silva 2001)

Tomando-se em consideração os seguintes valores de parâmetros na equação acima:

a) nível de significância de 95% na determinação dos intervalos de confiança, correspondendo a $z=1,96$; b) erro de amostragem de 15% ($d=0,15$) relativo à diferença máxima aceitável entre a estimativa amostral e o parâmetro populacional; c) Uma proporção a ser estimada em cada sub-grupo populacional da ordem de 50% ($P=0,50$), por ser a de a maior variabilidade e conduzir a obtenção de estimativas amostrais conservadoras e um efeito de delineamento de 2, obteve-se uma estimativa do tamanho da amostra que foi de 85 pessoas por sub-grupo de sexo/faixa etária.

Prevendo-se a ocorrência de 20% de recusas ou outras causas de não resposta, o tamanho da amostra foi corrigido através da razão $85/0.80$ conduzindo a estimativa corrigida n_0' de 107 pessoas por sub-grupo de sexo e faixa etária. Desta forma, foram estudadas as condições de morbidade referida em 856 pessoas (8 grupos sexo/idade multiplicados por 107 pessoas) em cada um dos 3 municípios estudados, totalizando 2568 pessoas cujo perfil de morbidade referida foi determinado.

Considerando-se uma proporção mediana conservadora de 4 pessoas por domicílio no interior do estado do Pará, foram amostrados 214 domicílios em cada um dos municípios (total de 642 domicílio).

A seleção dos domicílios foi realizada através de sorteio de setores censitários em cada um dos municípios e posteriormente de domicílios em cada um dos mesmos. Todos os moradores de cada domicílio sorteado foram convidados a participar do inquérito com a totalização da estimativa de 107 participantes por sub-grupo e faixa etária.

Os domicílios selecionados foram utilizados para a caracterização radiológica (radônio e exposição externa gama) e para o inquérito de morbidade.

Caracterização radiológica ambiental

Uma ampla caracterização radiológica ambiental da região de Monte Alegre foi realizada através das seguintes etapas: a) Determinação da concentração de radônio dentro das residências selecionadas; b) Determinação da exposição externa gama dentro das residências selecionadas (kerma no ar); c) Determinação da exposição externa gama na área externa (ruas da cidade) utilizando espectrometria gama *in situ*; d) Determinação da concentração de atividade de radionuclídeos em água potável e alimentos mais consumidos na região. Com base em todos estes resultados foi possível estimar a dose efetiva anual que a população de Monte Alegre recebem.

a) Determinação da concentração de radônio dentro de casa;

A determinação das concentrações de radônio nas residências selecionadas foi realizada através da técnica de detectores de traços utilizando Makrofol como detectores de partículas alfa. Em cada residência, foram colocados 2 detectores de radônio (um na sala e outro no quarto) a uma altura de 1 m do piso, e deixados na residência por um período de 3 meses. Após este período, os detectores foram recolhidos e transportados para o laboratório de radônio do Instituto de Radioproteção e Dosimetria onde foram preparados e analisados de acordo com Binns et al. (1998). Alguns detectores de trânsito foram utilizados como controle da exposição durante o trajeto. A concentração de radônio em cada residência foi dada em Bq/m³.

Uma vez que o levantamento de radônio realizado por Melo(1999) em Monte Alegre compreendeu apenas 44 residências (18 na área rural e 26 na área urbana). Pretendeu-se neste projeto ampliar a rede de amostragem, realizando medidas em cerca de 214 residências em cada município. Sendo assim o número de residências monitoradas para radônio foi aproximadamente 1% do total das residências do município. Dubois (2005) faz um resumo dos levantamentos de concentração de radônio realizados em residências de vários países da Europa. A porcentagem de residências monitoradas em toda Europa foi de aproximadamente 1,12%, variando de 0,01% na Albânia a 22% na Suécia (Dubois, 2005).

Para cada residência monitorada, dados como tipo de residência (alvenaria, madeira, outros materiais), tempo de residência dos moradores, endereço completo e localização através de coordenadas geográficas utilizando GPS (Global Position System) foram coletados. Cerca de 5 detectores de trânsito foram utilizados como controle da exposição durante o trajeto.

b) Determinação da exposição externa gama dentro de casa (kerma no ar)

A taxa de exposição externa gama foi medida nas mesmas residências selecionadas para a monitoração da concentração de radônio. Em cada residência foi instalada juntamente com o detector de radônio, dosímetros termoluminescentes (TLDs) utilizando detetores de LiF:Mg,Cu,P e LiF:Mg,Ti da Harshaw Chemical Company. Em cada residência, foram instalados 3 dosímetros termoluminescentes, permanecendo no local por 3 meses. Após este período, os dosímetros foram recolhidos e transportados para o laboratório de dosimetria externa do Instituto de Radioproteção e Dosimetria para processamento e análise. A taxa de dose externa é dada pela taxa de kerma no ar em $\mu\text{Gy h}^{-1}$. Cerca de 5 detectores de trânsito foram utilizados como controle da exposição durante o trajeto.

- c) Determinação da exposição externa gama na área externa (ruas da cidade) utilizando espectrometria gama *in situ*;

A determinação da exposição externa gama na área externa foi realizada utilizando um sistema de espectrometria gama *in situ* com detectores de NAI (TI) de 0,1 L e 0,4 L. Detalhes do método de medida e calibração podem ser vistos em Sachet (2002). O sistema é composto de um espectrômetro de raios Gama GR-820 da Exploranium Canadá com o sistema de detectores colocados no teto de um automóvel. A radiação externa gama é medida ao longo do percurso feito pelo automóvel. Para cada medida registrada a coordenada geográfica é registrada. Este sistema é amplamente utilizado em situações de emergências radiológicas para localizar focos de contaminação, assim também como tem sido utilizado para medir a radiação gama externa em regiões de radiatividade natural elevada (Sachet, 2000, Veiga et al, 2003).

Estimativa da dose efetiva anual para a população de Monte Alegre, considerando as principais vias de exposição à radiação.

A quantificação da exposição à radiação foi feita com base na dose efetiva comprometida das populações em estudo. A dose foi calculada para 3 grupos de faixas etárias, adultos, crianças de 1 a 10 anos e crianças menor que 1 ano, considerando a exposição à radiação externa gama, a exposição ao radônio dentro de casa e a exposição interna devido à ingestão de água e alimentos da região.

Para a exposição intra-domiciliar ao radônio, a dose efetiva anual é dada por:

$$\text{Dose efetiva(Rn)} = C_{Rn} \cdot Feq \cdot T \cdot F_{oc} \cdot FCD_{Rn}$$

Dose efetiva (Rn)= Dose efetiva anual devido à exposição ao radônio dentro de casa (mSv/ano)

C_{Rn} = Concentração de atividade média de radônio dentro de casa em $Bq.m^{-3}$

F_{eq} = Fator de Equilíbrio para radônio dentro de casa = 0,4

T = Numero de horas em 1 ano = 8760

F_{oc} = Fator de ocupação dentro de casa = 0,8

FCD_{Rn} = Fator de conversão de dose para radônio = $6 \text{ nSv/Bq.h.m}^{-3}$

Para a exposição à radiação externa gama, a dose efetiva anual é dada por:

$$\text{Dose efetiva(gama)} = (K_{ext} \cdot T \cdot F_{oc-ext} \cdot FCD) + (K_{int} \cdot T \cdot F_{oc-int} \cdot FCD)$$

Dose efetiva (gama)= Dose efetiva anual devido à exposição à radiação externa gama dentro e fora de casa (mSv/ano)

K_{ext} = Valor médio da taxa de kerma no ar dentro de casa ($nGy.h^{-1}$)

K_{int} = Valor médio da taxa de kerma no ar fora de casa ($nGy.h^{-1}$)

T = Numero de horas em 1 ano = 8760

F_{oc-ext} = Fator de ocupação dentro de casa = 0,8

F_{oc-int} = Fator de ocupação fora de casa = 0,2

FCD = Fator de conversão de dose para exposição externa gama = $0,7 \text{ Sv.Gy}^{-1}$

Outras vias de exposição não foram consideradas como a exposição externa devido a imersão água de rio, dose interna devido à ingestão de produtos de origem animal (leite e carne). Desta forma, o cálculo de dose para a população de Monte Alegre foi devido principalmente a exposição ao radônio, exposição externa gama e devido à ingestão de alimentos e água sendo estas vias as maiores contribuintes para a dose devido à exposição a radiação natural.

