

Isabelle Magliano Duarte

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES  
XRCC1 (Arg399Gln) E XPD (Lys751Gln) RELACIONADOS À MANUTENÇÃO DA  
ESTABILIDADE DO GENOMA EM INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO RESIDENTE  
DO MUNICÍPIO 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 Bonacossa  
de Almeida - IRD/CNEN  
Co-Orientador: Dr<sup>a</sup> Lene Holanda Sadler  
Veiga - IRD/CNEN

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

2010

Duarte, Isabelle Magliano

Avaliação da Frequência de Polimorfismos nos genes XRCC1 (Arg399gln) e XPD (Lys751gln) relacionados à manutenção da estabilidade do genoma em indivíduos da população residente do Município de Monte Alegre, PA

Isabelle Magliano Duarte [Rio de Janeiro] 2010

Xiv, 96 p. 29,7 cm: il. Graf., tab.

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

1. Radiação Ionizante; 2. XRCC1; 3. XPD; 4. Mecanismos de reparo; 5. Polimorfismo

I. Instituto de Radioproteção e Dosimetria II. Título

Isabelle Magliano Duarte

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NOS GENES  
XRCC1 (Arg399Gln) E XPD (Lys751Gln) RELACIONADOS À MANUTENÇÃO DA  
ESTABILIDADE DO GENOMA EM INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO RESIDENTE  
DO MUNICÍPIO DE MONTE ALEGRE, PA

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2010.

---

Dr. Denison de Souza Santos - IRD/CNEN

---

Dr. Evaldo Simões da Fonseca - IRD/CNEN

---

Dr. Alphonse Germaine Albert Charles Kelecom - UFF

---

Dra. Maria Angélica Vergara Wasserman - IRD/CNEN

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida no Laboratório de Radiobiologia, e co-orientação da Dra. Lene Holanda Sadler Veiga.

## **Dedicatória**

Este trabalho dedico  
a meus pais, Paulo e Ione,  
meu marido, Felipe  
e a minha avó, Glória,  
de quem terei saudades eternas.

## **Agradecimentos**

A Deus, acima de tudo, por minha vida e minha família.

A meus pais, que sempre estiveram a meu lado e cuidaram para que eu tivesse uma boa educação.

A meu esposo, Felipe, pelo amor e apoio a todo o momento.

A meu orientador, Carlos, por ter me recebido em seu laboratório e possibilitado que eu pudesse aprender muito do que sei hoje.

A minha co-orientadora, Lene, por seu apoio no desenvolvimento e escrita deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, por sempre estarem a meu lado.

À amiga Monica, a quem devo muito do que aprendi durante minha passagem pelo IRD.

À amiga Angélica, pela companhia no longo trajeto casa-IRD e pelas conversas de amizade e apoio.

Aos órgãos de apoio financeiro deste trabalho: IRD-CNEN, Capes e Fiocruz.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## Resumo

A exposição do homem à radiação ionizante oriunda de fontes naturais é uma característica inerente à vida dos seres humanos na Terra. A radiação ionizante é um reconhecido agente genotóxico, o qual pode afetar moléculas biológicas, podendo causar danos ao DNA e à estabilidade genômica. O sistema celular de reparo de DNA tem um importante papel na manutenção da estabilidade genômica através do reparo de danos causados no DNA por agentes genotóxicos. No entanto, 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 de nucleotídeo único (SNP) nos genes de reparo de DNA XRCC1(Arg399Gln) e XPD (Lys751Gln) em uma população do Município de Monte Alegre, que reside em uma área de maior exposição à radioatividade natural. Foram realizadas coletas de amostras de saliva de indivíduos da população de Monte Alegre, sendo 40 amostras de homens e 46 amostras de mulheres. Através da técnica de RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) foi determinada a frequência dos genótipos homozigotos e/ou heterozigotos de genes polimórficos. O gene XRCC1 teve 65,4% da presença do alelo 399Gln e no gene XPD encontramos 32,9% do alelo 751Gln. Esses valores estão semelhantes aos encontrados em estudos anteriores para o gene XPD, enquanto que XRCC1 apresentou uma frequência bem maior que a descrita na literatura. A influência desses polimorfismos, os quais estão envolvidos no reparo do DNA e a conseqüente genotoxicidade induzida pela radiação ionizante depende da dose de exposição e de fatores como o fumo, estatisticamente um fator para vigilância à saúde pública na região. Esse estudo reuniu informações moleculares e fatores epidemiológicos para uma avaliação do risco ao câncer na população de Monte Alegre.

Palavras Chave: Radiação Ionizante, polimorfismo, XRCC1 e XPD

## Abstract

The human exposure to ionizing radiation coming from natural sources is an inherent feature of human life on Earth. Ionizing radiation is a known genotoxic agent, which can affect biological molecules, causing DNA damage and genomic instability. The cellular system of DNA repair plays an important role in maintaining genomic stability by repairing DNA damage caused by genotoxic agents. However, genes related to DNA repair may have their role committed when presenting a certain polymorphism. This study intended to analyze the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of DNA repair XRCC1 (Arg399Gln) and XPD (Lys751Gln) in a population of the city of Monte Alegre, that resides in an area of high exposure to natural radioactivity. Samples of saliva were collected from individuals of the population of Monte Alegre, in which 40 samples were of male and 46 female. Through the use of RFLP (length polymorphism restriction fragment) the frequency of homozygous genotypes and / or heterozygous was determined for polymorphic genes. The XRCC1 gene had 65.4% of the presence of the allele 399Gln and XPD gene had 32.9% of the 751Gln allele. These values are similar to those found in previous studies for the XPD gene, whereas XRCC1 showed a frequency much higher than described in the literature. 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, statistically a factor in public health surveillance in the region. This study gathered information and molecular epidemiology for risk assessment of cancer in the population of Monte Alegre.

*Keywords: Ionizing Radiation, polymorphisms, XRCC1 and XPD*



## Índice

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Fontes de exposição à radiação natural .....	1
1.2. Áreas de radioatividade natural elevada no Brasil .....	3
1.3. O município de Monte Alegre, PA.....	4
1.4. Estudos epidemiológicos em áreas de radioatividade natural elevada.....	6
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>10</b>
2.1. Objetivo específico .....	10
<b>3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>11</b>
3.1. As radiações ionizantes, o DNA e o Câncer.....	11
3.2. O Reparo do DNA frente à radiação ionizante.....	13
3.2.1. A radiólise da água como efeito indireto da radiação .....	15
3.3. Vias de reparo de DNA de interesse.....	16
3.4. Reparo por excisão de bases (BER) .....	16
3.5. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER).....	18
3.6. Polimorfismos Genéticos.....	22
3.7. Polimorfismos de genes de estudo.....	24
3.7.1. XRCC1 .....	24
3.7.1.1. XRCC1 x câncer.....	26
3.7.2. XPD .....	27
3.7.2.1. XPD x câncer.....	29
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
4.1. Área de Estudo: Monte Alegre .....	32
4.2. Escolha dos indivíduos e coletas das amostras.....	32
4.3. Purificação do DNA .....	33

4.4.	Quantificação de DNA .....	34
4.5.	Amplificação pelo método PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	35
4.6.	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de Restrição - RFLP .....	37
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
5.1.	Quantificação de DNA .....	40
5.2.	Frequências alélicas .....	40
5.3.	Frequência Genotípica .....	42
5.3.1.	Frequência genotípica de acordo com sexo e idade .....	43
5.3.2.	Frequência genotípica entre grupos populacionais expostos a fatores de risco externo para câncer .....	46
5.3.3.	Frequência genotípica entre indivíduos que apresentam doenças crônicas....	48
5.4.	O Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	49
5.5.	O cálculo da estimativa de incerteza .....	52
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
	ANEXO I: A CARACTERIZAÇÃO RADIOLÓGICA AMBIENTAL DA REGIÃO DE MONTE ALEGRE .....	73
	ANEXO II: Quadro 1 .....	81

## Lista de Figuras

Figura 1- Mecanismos de reparo aos diferentes agentes causadores de dano ao DNA – Adaptação Hoeijmakers, 2001.....	14
Figura 2 – Representação esquemática do reparo por excisão de base do gene XRCC1- <i>Adaptado de: <a href="http://www.nature.com/.../n11/thumbs/1209370f1th.jpg">www.nature.com/.../n11/thumbs/1209370f1th.jpg</a></i> .....	18
Figura 3 – Representação esquemática do reparo por excisão de nucleotídeos do gene XPD - <i>Adaptado de:</i> <i><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed&amp;part=A3935">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed&amp;part=A3935</a></i> .....	21
Figura 4 – Representação esquemática do cromossomo 19 humano com indicação do gene XRCC1, localizado na posição 19q13.2. ....	26
Figura 5: Representação esquemática do cromossomo 19 humano com indicação do gene XRCC1, localizado na posição 19q13.3. ....	28
Figura 6 - Mapa da Região norte abrangendo Monte Alegre e cidades próximas .....	32
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose de amostras digeridas com a enzima de restrição MspI para o gene XRCC1.....	39

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Condições físicas dos genes no processo de amplificação das amostras .....	36
Tabela 2 - <i>Primers</i> específicos de cada gene para a realização do PCR .....	36
Tabela 3 - Genes e suas enzimas de restrições correspondentes .....	37
Tabela 4 - Tamanho dos fragmentos de interesse após o corte com cada enzima de restrição .....	38
Tabela 5 - Frequências nos alelos dos genes de estudo .....	41
Tabela 6 – Frequências dos genótipos dos genes de estudo na população total.....	42
Tabela 7 – Análise das frequências por sexo dos genes estudados .....	44
Tabela 8 - Análise das frequências por idade* dos genes estudados.....	45
Tabela 9 - Frequências genotípicas nas áreas de residência .....	47
Tabela 10 – Frequências genotípicas e seu percentual nos tercis.....	48
Tabela 11 – Valor do <i>p</i> – <i>Value</i> para cada fator analisado .....	49

## Lista de Fórmulas

Fórmula 1– Fórmulas a partir das quais as frequências alélicas ( $p$ e $q$ ) podem ser calculadas.....	50
Fórmula 2– Fórmula do calculo da expectativa de Hardy-Weinberg.....	51
Fórmula 3- Teste Chi-quadrado de Pearson .....	52

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AP	Sítio apurínico 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
HWE	Equilíbrio de Hardy- Weinberg
INB	Indústrias Nucleares Brasileiras
LET	Transferência Linear de Energia
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	Reação de polimerase cadeia
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RI	Radiação Ionizante
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
UV	Ultravioleta

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Fontes de exposição à radiação natural

A exposição de seres humanos à radiação ionizante (RI) proveniente de fontes naturais ocorre principalmente através de minerais encontrados na crosta terrestre. Essa é uma característica intrínseca e inevitável da vida dos seres humanos na Terra, pois eles estão expostos à RI proveniente de fontes naturais. De uma forma geral, há duas fontes principais de exposição natural: a exposição à radiação cósmica e aos radionuclídeos cosmogênicos, e àquela associada aos radionuclídeos naturais presentes na crosta terrestre (VEIGA *et al.*, 2003).

A exposição natural associada aos radionuclídeos presentes na crosta terrestre é decorrente geralmente de radionuclídeos das séries naturais do  $^{238}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$ . As principais vias de exposição são: irradiação interna, devido à incorporação de radionuclídeos encontrados na crosta terrestre, seja por inalação de partículas radioativas e inalação de gases radioativos como radônio e tório e/ou ingestão de radionuclídeos presentes na água; e a irradiação externa devido à radiação gama proveniente dos filhos do radônio a partir do solo, rochas e ar (CARDIS *et al.*, 2005).

O radônio é um gás radioativo que se origina no decaimento do  $^{226}\text{Ra}$ , que pertence à série do Urânio-238. Por ser um gás, o radônio é capaz de entrar nos ambientes e se acumular, e níveis elevados desse gás podem ser observados onde há pouca ventilação. Esse gás fica confinado em ambientes fechados ou pouco ventilados, como minas subterrâneas. O aumento de sua concentração no ar implica no conseqüente aumento de

seus produtos  $\alpha$ -emissores de meia-vida curta, o  $^{218}\text{Po}$  e o  $^{214}\text{Po}$ . Esses produtos são extremamente radiotóxicos e de grande abundância no meio ambiente, tornando o radônio de grande importância, do ponto de vista da radioproteção (NRC, 1988). A energia das partículas alfa liberadas pelos produtos de decaimento do  $^{218}\text{Po}$  e do  $^{214}\text{Po}$  são depositadas nas células do epitélio respiratório, sendo consideradas as causadoras do câncer de pulmão associado à exposição ao radônio (KREWSKI *et al.*, 2005).

As atividades humanas e hábitos de vida podem influenciar a exposição à radiação natural. Isto é importante, particularmente, para a exposição ao radônio e seus filhos de meia-vida curta. A exposição ao radônio em residências é influenciada pelo local onde um determinado grupo populacional está situado, do tipo de construção que caracteriza sua moradia, o tipo de material utilizado na construção e da ventilação destas construções.

Estudos com trabalhadores de minas subterrâneas expostos a radônio e seus produtos de decaimento têm demonstrado um aumento no risco de câncer de pulmão, quando comparado com um grupo não exposto (NRC, 1988). Embora a exposição ao radônio seja reconhecida como a segunda causa de câncer de pulmão depois do fumo, o risco deste tipo de câncer para o público em geral ainda era obtido através da extrapolação dos dados obtidos nos estudos em trabalhadores mineiros, uma vez que os estudos epidemiológicos de radônio em residências não foram capazes de demonstrar este risco. Somente recentemente, obtiveram-se evidências diretas deste risco através da análise combinada de diversos estudos conduzidos na Europa, América do Norte e China (DARBY *et al.*, 2005, KREWSKI *et al.*, 2005, LUBIN *et al.*, 2004).



O Comitê Científico das Nações Unidas sobre Efeitos da Radiação Atômica - UNSCEAR estima uma dose efetiva anual para a população mundial decorrente da exposição à radiação natural de 2,4 mSv, variando de 1 a 10 mSv (UNSCEAR, 2000). 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, sendo juntas cerca de 70% da dose total recebida anualmente pelo homem devido a fontes naturais. Geralmente, um aumento da exposição à radioatividade natural está relacionado a uma maior exposição ao radônio e à exposição à radiação gama terrestre (GREENLEE *et al.*, 2001).

## **1.2. Áreas de radioatividade natural elevada no Brasil**

Diversos trabalhos foram realizados no Brasil em áreas ditas como de radioatividade natural elevada, devido à anomalias geológicas de urânio e tório em depósitos geológicos. Como exemplo de algumas destas áreas temos o planalto de Poços de Caldas (MG), Guarapari (ES), Itataia (CE), Lagoa Real (BA), Araxá (MG), Buena (RJ), Catalão (GO), Figueira (PR) e Monte Alegre, no estado do Pará, entre outras de menor importância econômica (CULLEN *et al.*, 1977, PENNA FRANCA *et al.*, 1965, AMARAL *et al.*, 1992).

A maioria dos estudos realizados nestas áreas de radiação natural elevada teve o objetivo a caracterização radiológica da região do ponto de vista da estimativa da exposição externa e contaminação da interna, pela ingestão de alimentos cultivados no local, e inalação de radônio, tório e seus filhos. O único estudo que teve como objetivo avaliar possíveis efeitos à saúde decorrentes da exposição crônica à RI foi um estudo

realizado na década de 70, que realizou uma avaliação citogenética na população residente em Guarapari. Este estudo mostrou um aumento no número de aberrações cromossômicas na população investigada quando comparada a um grupo controle (BRANDOM *et al.*, 1978).

Embora a radioatividade natural em algumas das regiões citadas acima apresente valores mais elevados quando comparados a outras cidades do Brasil, as exposições aí verificadas não são representativas da exposição média de toda a população que vive nestes locais, uma vez que os níveis de radioatividade mais elevados, geralmente, restringem-se às áreas próximas às anomalias geológicas. VEIGA *et al.* (2000) questionam a classificação das *Áreas Brasileiras de Radioatividade Natural Elevada*, tendo em vista que critérios como homogeneidade de exposição e número de pessoas realmente expostas não tem sido levados em consideração. Este tipo equivocado de classificação pode levar a um sentimento de radiofobia na população e a uma associação equivocada com casos de câncer, má-formação congênita e outros agravos à saúde.

### **1.3. O município de Monte Alegre, PA**

O município de Monte Alegre, localizado no Estado do Pará, é um dos mais antigos povoados da Amazônia, cujo assentamento ocorreu há milhares de anos. A área é situada na porção central da Bacia Sedimentar do Rio Amazonas, onde ocorrem rochas com idades do Paleozóico ao Quaternário. Lá vive uma população estimada de cerca de 68.000 pessoas numa área de aproximadamente 21.703 km<sup>2</sup>.

Na década de 70, levantamentos radiométricos e caracterizações geológicas foram 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 *et al.*, 1999).

Trabalhos desenvolvidos pela extinta Nuclebrás, atual Indústrias Nucleares Brasileiras (INB), em Monte Alegre revelaram anomalias de urânio ( $U_3O_8$ ) no membro Barreirinha e em sedimentos de corrente na área do Domo. A presença dessa ocorrência uranífera foi investigada pela INB com o objetivo de avaliar a viabilidade econômica para exploração desse depósito. Os estudos de pesquisa e prospecção apontaram para a inviabilidade econômica deste depósito. No entanto, a radioatividade das rochas passou a constituir um problema para a população de Monte Alegre, a partir do momento em que estas rochas contendo urânio começaram a ser utilizadas, indevidamente, na construção civil, no revestimento interno de residências, pavimentação de calçadas e ruas.

Medidas realizadas pela Universidade do Pará revelaram valores elevados de exposição externa gama em locais específicos, o que causou grande polêmica na região. A partir de então, rumores de que a incidência de câncer na região é aumentada tem sido veiculada na mídia local. Embora a radioatividade natural em Monte Alegre seja compatível com os níveis encontrados em outras cidades do Brasil e do mundo, não se pode afirmar que a incidência de câncer na região é aumentada, conforme divulgado na imprensa local. Uma vez que a cidade não possui registro de câncer de base populacional, não foi possível avaliar a incidência de câncer na região. MELO *et al.* (2009) avaliaram o padrão de mortalidade por câncer em Monte Alegre e cidades

vizinhas e concluíram que a análise das distribuições da mortalidade e da incidência de câncer não apresentaram evidências de um excesso de risco de câncer em Monte Alegre.

#### **1.4. Estudos epidemiológicos em áreas de radioatividade natural elevada**

Considerando os resultados dos estudos realizados com sobreviventes da bomba atômica, assim como aqueles provenientes de exposições médicas, de acidentes e de testes nucleares, a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (IARC) considera a exposição à RI como um agente carcinógeno aos seres humanos. Estudos têm demonstrado que há uma forte associação da exposição à radiação em altas doses com o desenvolvimento de vários tipos de câncer (IARC, 2001).

As populações que vivem em áreas de radioatividade natural elevada são uma importante fonte de informações sobre os efeitos da exposição crônica a baixas doses de RI. Estudos epidemiológicos têm sido conduzidos principalmente em regiões como China, Índia e Irã. No entanto, até o presente, estes estudos não conseguiram estabelecer nenhuma associação entre o câncer e a exposição à RI (UNSCEAR, 1994).

Em uma revisão de estudos epidemiológicos realizados em áreas de baixa radioatividade natural, *CARDIS et al.* (2005) conclui que não é possível avaliar a existência do risco devido à exposição a baixas doses em áreas de radiação natural elevada, devido principalmente à falta de poder estatístico. Alguns outros estudos ecológicos sugerem uma associação entre exposição à radiação natural e câncer, no entanto os resultados destes tipos de estudos não devem ser interpretados de forma a estabelecer nexo de causalidade, uma vez que os mesmos são particularmente sensíveis

à fatores de confundimento, devendo ser interpretados com cuidado (KNOX *et al.*, 1988).

Uma coorte populacional, na China, de residentes em uma área de radiação natural elevada e de uma área controle tem sido acompanhada prospectivamente quanto ao perfil de mortalidade (CHEN *et al.*, 1991). No período de 1979 a 1998, 1.992.940 pessoas-ano sob risco foram acumuladas com o seguimento de 125.079 indivíduos, observando-se 12.444 óbitos, dos quais 1.202 óbitos por câncer, 1.204 óbitos por causas externas e 10.038 óbitos por outras causas não neoplásicas. Entre os óbitos por câncer, os mais frequentes foram câncer de fígado, nasofaringe, pulmão, estômago e leucemia. A análise da mortalidade para todos os cânceres não mostrou diferenças significativas entre a área de radiação natural elevada e a área controle (Risco Relativo (RR)=1.00; 95% CI: 0.89-1.14).

Na Índia, AKIBA *et al.* (1999) relataram dados da incidência de câncer observada através da análise de dados de um registro de câncer de base populacional estabelecido em 1990 na costa de Kerala, uma área de radioatividade natural elevada. A partir da caracterização radiológica da área onde reside uma população de cerca de 360.000 pessoas, foi possível estimar uma dose efetiva anual para a população residente variando de 0,3 a 34 mSv. A taxa padronizada de incidência de câncer observada na área foi de 104,2 por 100.000 para homens e 74,8 por 100.000 para mulheres, não sendo diferente da incidência observada em outras áreas da Índia onde funcionam registros de base populacional. Em uma análise preliminar, os níveis de radiação observados na região foram agrupados em níveis de radiação alto, médio e baixo, e a taxa de incidência de câncer estimada para cada grupo com diferentes níveis de radiação.

Nenhum aumento aparente na incidência geral de câncer foi observado para ambos os sexos com relação aos níveis de radiação (AKIBA, 1999).

No Brasil, estudos epidemiológicos nas áreas de radiação natural elevada são raros. Os autores VEIGA e KOIFMAN avaliaram em 2005 o padrão de mortalidade por câncer de algumas regiões brasileiras ditas de radioatividade natural elevada, como Poços de Caldas, Araxá e Guarapari. Os resultados mostram que, para Poços de Caldas e Guarapari, a mortalidade por câncer foi maior do que se poderia esperar, tendo como população de referência as dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais, respectivamente. Para Poços de Caldas, observou-se um aumento significativo na mortalidade por câncer de estômago, pulmão, mama e leucemia. Em relação a Guarapari, um aumento significativo na mortalidade foi observado para câncer de esôfago, estômago, pulmão e próstata, enquanto que para Araxá, nenhum excesso de óbito por câncer foi observado. Os autores ressaltam que estes resultados são importantes, uma vez que se desconhecia até então o padrão de mortalidade por câncer destas regiões. Diante desses dados, não se pode negar a existência de um aumento na mortalidade por câncer em Poços de Caldas, embora não se possa associar este aumento com a exposição à radioatividade natural, uma vez que deve-se levar em consideração os vários fatores de risco associados ao câncer. Araxá, que é reconhecidamente uma área de radioatividade natural elevada, não apresentou excesso de óbitos.

Estudos anteriores a esse, realizados na década de 70, avaliaram os possíveis efeitos à saúde decorrentes da exposição à radiação, através da avaliação citogenética da população residente de Guarapari e a de uma área controle (BARCINSKI, 1975). Os resultados mostraram um aumento no número de aberrações cromossômicas na

população investigada, quando comparada com um grupo controle. No entanto, outros fatores ambientais que poderiam estar associados às aberrações cromossômicas não foram investigados.

As incertezas quanto à confiabilidade dos resultados em estudos epidemiológicos realizados em populações expostas a baixas doses de radiação podem ser atribuídas a diversos fatores, como: dosimetria inadequada, faixas de doses estreitas, grupos controles inadequados e ainda os efeitos decorrentes dos fatores de confundimento. Estes fatores são potencialmente mais problemáticos quando o risco a ser detectado é muito pequeno frente aos riscos a que uma população está exposta (dieta, hábitos de fumo, exposições a carcinógenos ambientais, etc.). Entretanto, o maior problema nestes tipos de estudos é ainda a falta de poder estatístico, devido ao pequeno número de pessoas envolvidas e aos baixos valores de dose (VEIGA *et al.*, 2007).

## **2. OBJETIVO GERAL**

A caracterização genotípica relativa a genes ligados à manutenção da estabilidade do genoma nos indivíduos da população de Monte Alegre - PA.

### **2.1. Objetivo específico**

Avaliar a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único em dois genes relacionados à manutenção da estabilidade genômica (XRCC1 e XPD) em um grupo populacional com maior exposição ao radônio em relação a um grupo controle com menor exposição, residentes em Monte Alegre - PA.



### 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 3.1. As radiações ionizantes, o DNA e o Câncer

O DNA é o principal alvo da RI e sofre vários tipos de lesões, incluindo alterações de base, quebras de fita simples (SSB), e duplas (DSB) e ainda o dano oxidativo (LIU *et al.*, 2001, BELLI *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 *et al.*, 2008).

As radiações ionizantes podem provocar danos no material genético tais como quebra simples e quebras duplas do DNA, além quebras nas ligações hidrogênio, ligações moleculares e trocas ou perdas de bases (RON *et al.*, 1998).

Segundo LITTLE *et al.* (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 mostraram 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 hematopoiético, o tireoidiano, ósseo e mamário (PRESTON *et al.*, 2008). O aumento do câncer de tireóide foi descrito como consequência do acidente de Chernobyl (REINERS *et al.*, 2008).

Paralelamente à exposição natural, atividades humanas como lançamento de bombas nucleares (Hiroshima e Nagasaki, 1945) e acidentes em reatores de usinas (ex: Chernobyl, 1986) são em grande parte, responsáveis pela influência da RI no ambiente (UNSCEAR, 2006). Estudos com os sobreviventes dos ataques em Hiroshima e Nagasaki demonstraram o potencial da RI na indução de vários tipos de neoplasias. IMANAKA *et al.* (2006) apresentou dados sobre a incidência de leucemia, e de câncer sólido no período entre 1950 a 2000, entre 86611 sobreviventes, 47.685 morreram, cerca de 55% sendo 10.127 por câncer sólido e 296 por leucemia. Outro estudo no mesmo período de tempo mostra que dentre os 48000 sobreviventes de bomba atômica com elevadas doses de exposição, 5900 morreram de câncer sólido, onde 480 casos foram por exposição à radiação (KESTININA *et al.*, 2005). Outras pesquisas recentes demonstraram a influência das radiações ionizantes na formação de câncer sólido em sobreviventes de ataques por bombas atômicas (PRESTON *et al.*, 1997).

A exposição ao 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 câncer (MCDIARMID *et al.*, 2001, AMABILE *et al.*, 2009).

As leucemias ocorrem entre 2 e 5 anos após a exposição, e os tumores sólidos surgem entre 5 e 10 anos. RERICHA *et al.* (2006) indicaram uma associação entre a incidência de leucemia em mineradores de urânio no subsolo na República Tcheca com a exposição cumulativa ao radônio.

### **3.2. O Reparo do DNA frente à radiação ionizante**

O reparo de DNA é um processo em constante funcionamento nas células, sendo essencial para sua sobrevivência. Este mecanismo protege o genoma de danos que podem levar a mutações deletérias, e este está presente em todas as células e em todos os organismos. Em células humanas, tanto atividades metabólicas normais quanto fatores ambientais (como RI) podem causar danos no DNA, resultando em milhares de lesões moleculares individuais por dia. Essas lesões causam danos estruturais à molécula de DNA, e podem alterar o resultado da transcrição gênica, entre outras consequências. Conseqüentemente, o processo de reparo de DNA precisa estar operando constantemente, para corrigir rapidamente qualquer dano na sua estrutura (IMPROTA *et al.*, 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 mecanismo de reparo a agir no local da lesão. 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 transformação em câncer (VODICKA *et al.*, 2004). Em

situações onde os danos não podem ser reparados, a replicação coordenada pela DNA-polimerase é abortada e a célula morre (HOEIJMAKERS, 2001). Os principais mecanismos de reparo podem ser divididos em: MMR (*MisMatch Repair*- Reparo *MisMatch*), BER (*Base excision repair*- Reparo por excisão de base), NER (*Nucleotide excision repair*- Reparo por excisão de nucleotídeos), Reparo por Recombinação Homóloga, além do NHEJ (*Non-Homologous End-Joining* - união terminal não-homóloga) (Figura 1).

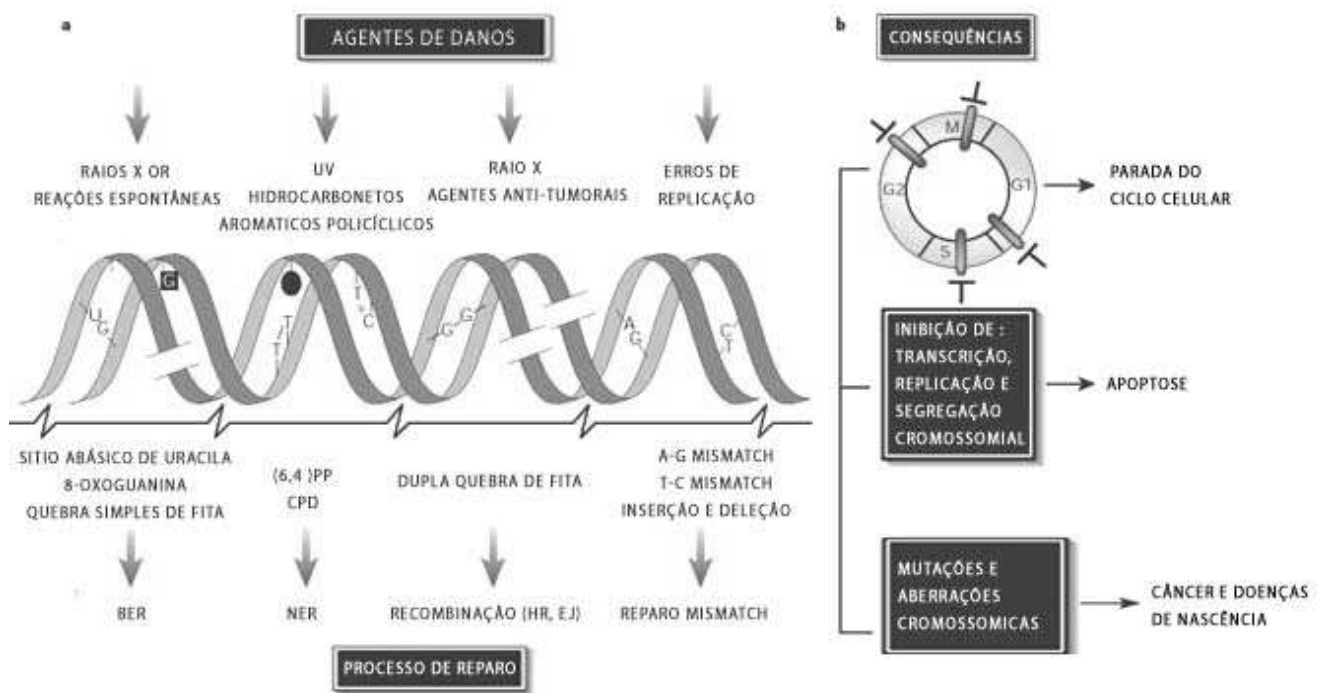


Figura 1- Mecanismos de reparo aos diferentes agentes causadores de dano ao DNA –  
Adaptação Hoeijmakers, 2001

As radiações ionizantes são consideradas a principal fonte causadora de quebras simples da fita de DNA. Os raios ionizantes interagem com o DNA tanto direta como

indiretamente. Dependendo do tipo de radiação, os efeitos diretos podem produzir danos biológicos, contabilizando de 30 a 40% das lesões celulares, e o efeito indireto pode ser responsável por 60 a 70% das lesões celulares (CALDENOTT *et al.*, 2008).

### **3.2.1. A radiólise da água como efeito indireto da radiação**

A radiólise da água consiste na decomposição da molécula de água pela deposição da energia da RI. Na espécie humana, há aproximadamente  $2 \times 10^{25}$  moléculas de água por quilograma, o que permite que se conclua que, em caso de exposição às radiações, essas moléculas são atingidas em maior número (BARATA-VALLEJO *et al.*, 2010).

A radiólise pode levar as moléculas de  $H_2O$  a um estado muito excitado ou então propiciar a formação de moléculas do tipo  $H_3O^+$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O^+$  e  $H_2O^-$ , os quais, por serem instáveis, podem levar à formação de radicais livres do tipo H e OH, que se caracterizam por serem muito reativos e por não possuírem carga elétrica. Em virtude disso, esses radicais livres podem alterar a estrutura das proteínas, dos lipídios e do DNA, entre outras macromoléculas.

Sendo formas altamente reativas, os radicais livres derivados da radiólise da água interagem quimicamente entre si ou com moléculas próximas a eles. Como consequência, moléculas do organismo vivo podem ser danificadas, passando a disputar elétrons com o meio e provocando um estresse oxidativo às células (DELIPETAR-GRULD *et al.*, 2004).

### **3.3. Vias de reparo de DNA de interesse**

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 em genes relacionados à manutenção da estabilidade do genoma pode influenciar na variação individual da capacidade de reparo do material genético. Desta forma, a presença de polimorfismos pode estar associado a um maior risco de desenvolver o câncer (BERWICK *et al.*, 2000, MOCELLIN *et al.*, 2009, ZIENOLDINNY *et al.*, 2006).

### **3.4. 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 DNAs glicosilases, que reconhecem e removem bases lesadas da cadeia do DNA através da quebra da ligação N-glicosil, a qual mantém a base nitrogenada associada ao esqueleto de açúcar-fosfato (FRIEDBERG *et al.*, 1995). A maioria das DNAs glicosilases reconhecem lesões específicas como a adenina metilada na posição 3 ou a 8-hidroxiguanina (BOITEUX *et al.*, 2000).

Após a retirada da base lesada, gera-se no DNA um sítio apurínico ou apirimidínico (AP) que será reparado por AP endonucleases (DOETSCH, 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 desoxirribofosfodiesterase (dRpase), para que uma DNA polimerase possa reconhecer e complementar a lacuna gerada pela retirada do nucleotídeo (FRIEDBERG *et al.*, 1995). Algumas vias específicas no reparo BER estão diminuídas em pacientes com câncer, podendo representar fator de risco.

O gene XRCC1 (*X-ray repair cross complementing group 1*) é um dos mais de 20 genes que participam da via de reparo por excisão de bases (BER). Ele codifica uma proteína cuja função é auxiliar na reparação de quebras de fita dupla, que são as lesões de DNA mais comuns (THOMPSON *et al.*, 2000). Evidências biológicas e bioquímicas indicam que XRCC1 interage com um complexo de proteínas de reparo de DNA, incluindo a poli(ADP-ribose) polimerase (Parp), a DNA ligase-3 e a DNA polimerase- $\beta$  (Figura 2) (CALDENOTT *et al.*, 1995). Há aproximadamente oito diferentes Polimorfismos de Nucleotídeo Único (em inglês, SNP) em XRCC1, três dos quais são comuns e levam à substituição de aminoácidos nos códons 194 (exon 6, base C para T, aminoácido Arg para Trp), 280 (exon 9, base G para A, aminoácido Arg para His) e 399 (exon 10, base G para A, aminoácido Arg para Gln) (<http://egp.gs.washington.edu>). Por ser localizado em uma região dentro do domínio de interação com a poli (ADP-ribose) polimerase, o polimorfismo Arg399Gln tem sido intensamente investigado, tanto por sua função como por sua associação com o risco de câncer. A presença do alelo variante Gln399 mostrou estar associado a uma reduzida capacidade de reparo de DNA, sendo avaliada pela persistência de adutos no DNA, elevados níveis de troca de cromátides irmãs, mutações em p53 e atraso prolongado do ciclo celular (SHEN *et al.*, 1998).

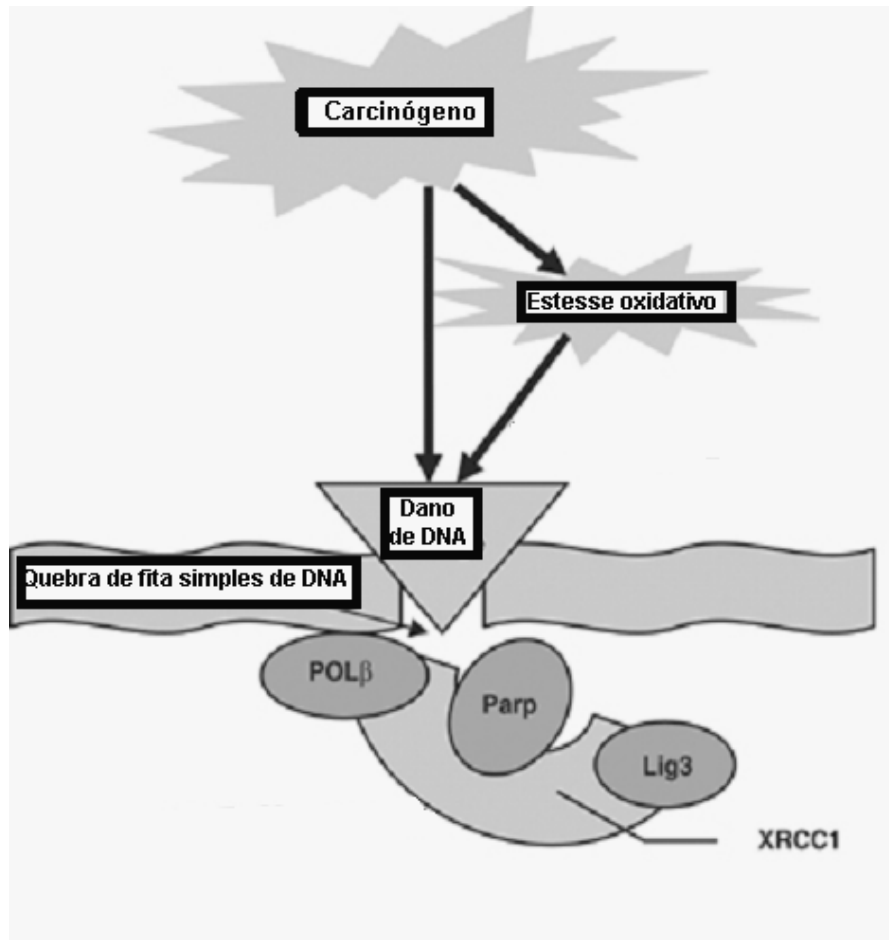


Figura 2 – Representação esquemática do reparo por excisão de base do gene XRCC1-  
 Adaptado de: [www.nature.com/.../n11/thumbs/1209370f1th.jpg](http://www.nature.com/.../n11/thumbs/1209370f1th.jpg)

### 3.5. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

Muitas vezes, o reparo por excisão de bases (BER) é insuficiente para lidar com certos tipos de danos de DNA, dessa forma, o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) age como uma via alternativa para o reparo. NER tem sido um dos sistemas de reparo mais estudados em humanos, o qual reconhece os danos baseando-se na estrutura anormal da dupla hélice, assim como da estrutura química (LIEBERLING *et al.*, 2006).

NER pode reparar uma grande variedade de danos de DNA, incluindo aqueles causados por Luz UV induzindo fotoprodutos de DNA e RI (MCCARTY *et al.*, 2007).



Este reparo consiste em um múltiplo processo, no qual as lesões de DNA são reconhecidas e demarcadas através do desenovelamento da dupla hélice. Em seguida, um trecho de aproximadamente 28 pares de base (pb) de DNA contendo o oligonucleotídeo danificado é retirado. A lacuna formada é preenchida usando-se como molde o DNA não danificado da outra fita (HASHIMOTO e EGLY, 2009). As consequências de um NER defeituoso são demonstradas por três síndromes recessivas e autossômicas: *xeroderma pigmentosum D* (XPD), *Síndrome de Cockayne* (SC) e *tricotiodistrofia* (TTD). Os pacientes com XPD demonstram uma severa sensibilidade ao sol, apresentando sardas e câncer de pele ainda durante a infância. Pacientes com SC também apresentam sensibilidade ao sol, severas anormalidades neurológicas e nanismo. Indivíduos com TTD apresentam deficiência de enxofre nos cabelos e nas unhas, o que resulta em seu estado quebradiço. Além disso, esses pacientes apresentam atraso no crescimento e retardo mental, assim como fotossensibilidade cutânea, embora sem predisposição ao câncer (STARY e SARASIN, 2002).

A proteína XPD, também chamada ERCC2 (*Excision Repair Cross-complementing Group 2*), é um componente chave da maquinaria responsável por NER e pelo reparo acoplado à transcrição (RAT) de DNAs danificados (BECK *et al.*, 2008). XPD é uma helicase que funciona como uma subunidade do complexo de transcrição TFIH. Ela promove a formação de uma “bolha” no sítio de DNA onde se encontra o dano, gerando o desenovelamento do DNA como preparação para os passos subsequentes (WU *et al.*, 2009). Para isto, XPD assume uma conformação apropriada para interagir com o DNA e com outros componentes do complexo TFIH. O domínio C-terminal de XPD é o sítio de interação com a proteína ativadora do complexo TFIH (Figura 3) (LEHMANN *et al.*, 2008). É neste domínio onde ocorre um dos mais comuns SNPs, o qual resulta na

substituição do aminoácido Glutamina (Gln) pela Lisina (Lys) no resíduo 751(BENHAMOU e SARASIN, 2005).

Embora os dados ainda sejam inconclusivos, evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que o polimorfismo em XPD pode alterar a capacidade de reparo de DNA e o risco de câncer. Dessa forma, é teoricamente possível que esse polimorfismo seja responsável por alterar a estrutura do domínio C-terminal e consequentemente a função da proteína XPD, perturbando as interações proteína-proteína e seu papel no reparo de DNA.

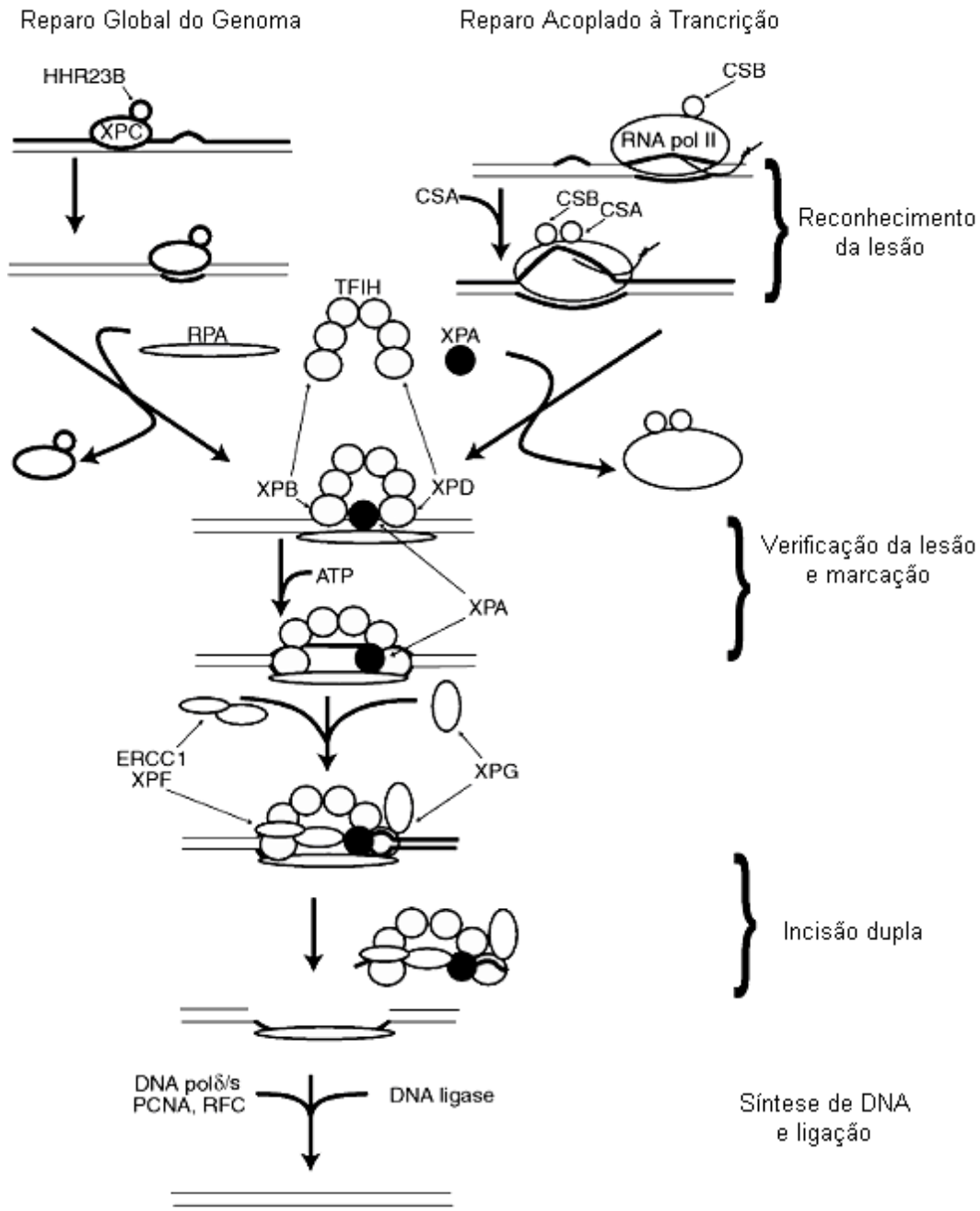


Figura 3 – Representação esquemática do reparo por excisão de nucleotídeos do gene

XPD

-

Adaptado

de:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed&part=A3935>

### 3.6. Polimorfismos Genéticos

Um outro 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 de pulmão em pessoas expostas a altos níveis de radônio.

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). Diversos polimorfismos de nucleotídeo único, nessa classe de genes, têm sido caracterizados em diversos grupos de indivíduos (FORD *et al.*, 2000, RUTAN *et al.*, 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). É importante ressaltar que os efeitos de um polimorfismo podem tornar-se aparentes somente quando da exposição a agentes genotóxicos endógenos ou ambientais (DE BOER *et al.*, 2002, THACKER *et al.*, 2005, HARMS *et al.*, 2004).

A combinação entre variantes polimórficas ocorridas em genes relacionados com manutenção da estabilidade do genoma pode conferir maior risco ao câncer em populações expostas ao radônio e a outros carcinógenos (KISH *et al.*, 1965). Desta forma, destaca-se o grande impacto deste conhecimento na saúde pública. As conseqüências da interação de polimorfismos comuns encontrados nessas vias

bioquímicas, com hábitos de vida e com o meio ambiente tornam-se de grande importância.

Polimorfismos genéticos são variações naturais na sequência de DNA ou cromossomo, que não causa eventos adversos no indivíduo e ocorre com frequência relativamente alta na população em geral. As variações genéticas que ocorrem em mais de 1% de uma população podem ser consideradas úteis para análise de polimorfismos genéticos (GENE TESTS, 2009).

O polimorfismo genético pode criar ou destruir sítios de enzimas de restrição. Algumas dessas alterações ocorrerão em sequências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções; outras ocorrerão em sequências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (LODISH *et al.*, 2002). Quando estão associados a apenas uma base, são SNP (polimorfismo de nucleotídeo único).

SNP é um tipo de marcador molecular capaz 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 SNP 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 (MOCELLIN *et al.*, 2009).

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único nessa classe de genes têm sido caracterizados em diversos grupos de indivíduos (FORD *et al.*, 2000, RUTAN *et al.*, 2002) sendo que em alguns casos essas mutações esporádicas encontram-se associadas a um aumento do risco de vários tipos de câncer (MOCELLIN *et al.*, 2009).

Polimorfismos não afetam apenas a susceptibilidade às doenças, mas também podem influenciar na resposta no tratamento terapêutico de pacientes (FORD *et al.*, 2000). É importante lembrar que os efeitos de um polimorfismo podem tornar-se aparentes somente quando há exposição a agentes genotóxicos endógenos ou ambientais (interação entre o genótipo e o estresse celular) (DE BOER *et al.*, 2002, THACKER *et al.*, 2005, HARMS *et al.*, 2004).

### **3.7. Polimorfismos de genes de estudo**

#### **3.7.1. XRCC1**

O gene XRCC1 (*X -ray repair cross-complementing group 1*) é um dos genes de reparo de DNA (Figura 4). Ele está envolvido com o reparo das bases danificadas e com as quebras de fita simples de DNA, de modo a ligar-se à enzima DNA ligase III em sua extremidade carboxil. Neste processo também estão envolvidas a DNA polimerase- $\beta$  e a poli ADP-ribose polimerase, que se ligam ao sítio de dano de DNA (WEI *et al.*, 2000).

A deleção de XRCC1 em camundongos resulta em um fenótipo embrionário letal (CHEN, 2002). Linhagens celulares CHO (*Chinese hamster ovary*) com mutações neste gene demonstraram uma habilidade reduzida em reparar quebras de fita simples de DNA e, em consequência, uma hipersensibilidade celular à RI e agentes alquilantes. XRCC1 desenvolve um papel essencial na remoção de danos de DNA endógenos e exógenos. Três polimorfismos no gene XRCC1 foram identificados: códon 194 (Arg para Trp), códon 280 (Arg para His) e códon 399 (Arg para Gln) (DUELL *et al.*, 2000). Esses polimorfismos, que envolvem uma mudança de aminoácido em regiões evolucionariamente conservadas, podem alterar a função de XRCC1. Estudos anteriores relataram que o alelo 399Gln de XRCC1 foi significativamente associado a altos níveis de adutos de DNA e glicoforina. Mutações em eritrócitos, aumento da frequência de troca de cromátides irmãs e aumento na sensibilidade à RI também estão associados a esse polimorfismo (MATULLO *et al.*, 2001).

As frequências dos alelos geralmente seguem padrões de etnia, raciais e geográficos. Diferenças nas frequências dos três polimorfismos do gene XRCC1 foram identificadas entre asiáticos e caucasianos. Há também estudos que sugerem que a associação entre polimorfismos e doenças nos grupos étnicos pode variar. Segundo YAN *et al.* em estudo de 2009, as frequências do alelo 399Gln são de 26% na população asiática, 39% em caucasianos, 30% em latinos e 10% em afro descendentes.

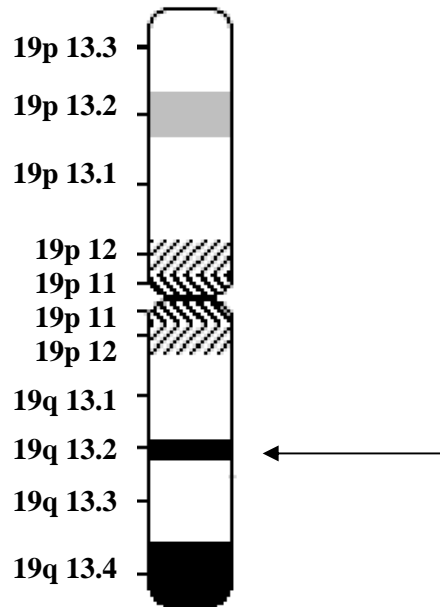


Figura 4 – Representação esquemática do cromossomo 19 humano com indicação do gene XRCC1, localizado na posição 19q13.2.

### 3.7.1.1.XRCC1 x câncer

A análise de estudos caso controle é o método mais prevalente de investigação entre uma doença e um gene específico (GENG *et al.*, 2009). Estudos envolvendo os polimorfismos de XRCC1 no câncer de mama vem apresentando, até o momento, resultados conflitantes. SAADAT *et al.* (2010) observaram que o alelo 399Gln pode atuar como um alelo recessivo e aumentar o risco ao câncer de mama. No entanto, COSTA *et al.* (2007) observaram que mulheres que apresentavam o genótipo de XRCC1 399Gln tinham um efeito protetor no que concerne ao câncer de mama. LOIZIDOU *et al.* (2008) encontraram em seus estudos que indivíduos homozigotos



para XRCC1 280His tinham um aumentado risco para o câncer de mama, mas muitos estudos concluíram que não há associação significativa entre a doença e o polimorfismo.

No caso de câncer gástrico, o estudo de RATNASINGHE *et al.* (2004) não conseguiu fazer nenhuma associação com o polimorfismo XRCC1 Arg399Gln, apesar de estudos anteriores apresentarem resultados contraditórios. No entanto, quando em conjunto com o hábito de fumar, a presença do polimorfismo XRCC1 Arg280His pode modificar o risco para câncer gástrico. Isto mostra o papel do ambiente na modulação do câncer (SAK *et al.*, 2007).

### **3.7.2. XPD**

Enzimas de reparo de DNA trabalham em conjunto para proteger o genoma das células da exposição à carcinógenos. XPD (*Xeroderma Pigmentosum complementation group D*) é um gene que está localizado no cromossomo 19, na posição 19q13.3 (Figura 5). Ele compreende 23 exons e vãos de 54.000 pares de base (WEBER *et al.*, 1990). O cDNA tem um tamanho de 2400 nucleotídeos. O produto do gene XPD é uma proteína de 760 aminoácidos, com um peso molecular de 86.900. Desempenha atividade de helicase, atuando como NER. Essa enzima tem um papel duplo na via NER, tanto desenovelando a dupla hélice do DNA no sítio das lesões quanto na transcrição do DNA (CAGGANA *et al.*, 2001). A via NER é a maior via celular para remoção de lesões mais volumosas de DNA, em particular, foto produtos induzidos por UV, mono adutos, *cross-links* e produtos de estresse oxidativo (QIAO *et al.*, 2002). A proteína XPD é essencial para NER, uma vez que se demonstrou que mutações pontuais nessa proteína

causam doenças como *xeroderma pigmentosum*, tricotiodistrofia e síndrome de Cockayne (LIANG *et al.*, 2003).

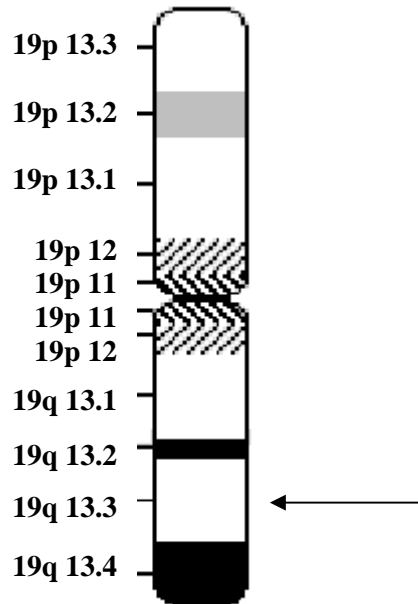


Figura 5- Representação esquemática do cromossomo 19 humano com indicação do gene XRCC1, localizado na posição 19q13.3.

Alguns importantes SNP já foram identificados no locus de XPD. Entre eles, o polimorfismo G / A no códon 312 do exon 10 que resulta em uma substituição Asp / Asn de uma região evolucionariamente conservada. Outro polimorfismo é a substituição de uma base C por uma A no códon 751 do exon 23, produzindo uma substituição Lys / Gln (ZHOU *et al.*, 2002). Esses fenótipos variantes têm sido associados a uma baixa capacidade de reparo de DNA ou um aumento no risco de aparecimento de câncer, isto baseado em estudos populacionais epidemiológicos (STURGIS *et al.*, 2002).

Um estudo sobre efeitos conformacionais do domínio c-terminal da proteína XPD (WHITE *et al.*, 2009) mostrou resultados que dão apoio à hipótese de que o polimorfismo na posição 751 de XPD pode influenciar na capacidade de reparo de DNA. Isso se dá através da alteração da estrutura do domínio c-terminal e, conseqüentemente, da quebra ou falha da sua interação com outros componentes da maquinaria de reparo. Por ser um polimorfismo comum em muitas populações (MATULLO, 2003), essas alterações conformacionais e seus efeitos funcionais podem somar para uma quantidade significativa na variabilidade no reparo de DNA observada e, por isso, aumento do risco de câncer nessas populações (MONACO, 2009).

#### **3.7.2.1. XPD x câncer**

O impacto dos SNPs no reparo e na susceptibilidade ao câncer ainda é incerto (BANERJEE *et al.*, 2006). Dados recentes mostram que os alelos XPD 312 Asp/Asn (heterozigoto polimórfico) e Asn/Asn (homozigoto polimórfico) foram associados com um aumento do risco de câncer de mama e pulmão, quando comparado ao homozigoto não-polimórfico (Asp/Asp). Já os alelos XPD 751 Lys/Gln (heterozigoto polimórfico) e Gln/Gln (homozigoto polimórfico) foram associados com um aumento no risco de câncer de mama quando comparado ao homozigoto não-polimórfico Lys/Lys (MANUGUERRA *et al.*, 2006).

Em um estudo sobre câncer colo-retal, SLIWINSKI *et al.* (2009) sugeram que não há associação do polimorfismo em XPD com este câncer, na população polonesa. Os resultados mostraram que as diferenças entre grupo controle e pacientes não foram significativas, apesar do autor ressaltar que estudos com uma população maior devem

ser realizados. A falta de associação entre o câncer colo-retal e o polimorfismo também foi observado em outros estudos (MORT *et al.*, 2003).

Um risco aumentado de câncer de pulmão foi estabelecido para a exposição ao radônio de trabalhadores ocupacionalmente expostos em diversas indústrias e em casa. (*International Agency for Research on Cancer monographs, 1972–2001* (<http://monographs.iarc.fr>)). Entretanto, a maior associação deste câncer ainda é com o fumo, como visto em diversos estudos. A presença dos polimorfismos tem sido um fator agravante para o aumento do risco de câncer de pulmão (LEHMANN *et al.*, 2001), principalmente quando o estudo envolve a combinação de vários polimorfismos. BENHAMOU e SARASIN (2005) encontraram um aumento significativo do risco para o câncer de pulmão em pessoas com cinco ou seis alelos variantes nos três polimorfismos: XPD Asp312Asn, XPD Lys751Gln e XRCC1 Arg399Gln em comparação com pessoas sem alelos variantes.

ZHANG *et al* (2009) descobriram que o polimorfismo de XPD no códon 312 estava associado com o câncer gástrico em estágio inicial. As frequências de genótipos heterozigotos polimórficos e homozigotos polimórficos foram significativamente mais elevadas nos pacientes que nos controles. Já o polimorfismo no códon 751 não teve associação com uma maior susceptibilidade ao câncer gástrico.

#### **4. METODOLOGIA**

Monte Alegre, juntamente com os municípios de Prainha e Alenquer, foram foco de um estudo de colaboração entre a Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ e o Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD) intitulado “Avaliação epidemiológica e caracterização radiológica ambiental na população residente dos municípios de Monte Alegre, Alenquer e Prainha-PA”, em que o objetivo foi avaliar os possíveis efeitos à saúde decorrentes da exposição a RI na população residente destes municípios.

A presente dissertação realizou um dos estudos moleculares de caracterização desta região, avaliando as diferenças do ponto de vista de polimorfismos genéticos em um grupo populacional mais exposto e um grupo controle.

No anexo I está contido o processo de amostragem da população de Monte Alegre, assim como a caracterização radiológica ambiental, as estimativas de dose anual e a avaliação da incidência de câncer e morbidade na região, estudos esses realizados pelo grupo da FIOCRUZ e IRD.

O projeto da pesquisa 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. Este projeto teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq através do edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saúde – Nº 24/2006 e da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN através da concessão de bolsa de Mestrado.

#### 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. Possui uma população de 68.000 pessoas numa área de aproximadamente 21.703 km<sup>2</sup> (IBGE, 2008).



Figura 6 - Mapa da Região norte abrangendo Monte Alegre e cidades próximas

#### 4.2. Escolha dos indivíduos e coletas das amostras

Após a realização da caracterização radiológica na região foi realizada a estimativa de dose efetiva decorrente da exposição ao radônio e exposição gama externa. O grupo mais exposto foi considerado aquele encontrado na faixa do terceiro tercil da distribuição de dose efetiva. O grupo menos exposto foi o encontrado no

primeiro tercil da distribuição de dose. Os valores dos primeiro e terceiro tercis foram, respectivamente, 2,0 e 4,2 (mSv.ano<sup>-1</sup>).

Para o presente estudo, foram extraídas 86 amostras de saliva dos indivíduos distribuídos pela população de Monte Alegre. As coletas foram realizadas em agosto de 2008 e foram coletadas 40 amostras de homens e 46 mulheres acima de 15 anos de idade. Para cada morador, foi coletada saliva contendo seu material genético.

A coleta da saliva foi realizada através do *Kit Oragene DNA Self - Collection* da DNAGenotek®. Este kit permite que a amostra coletada seja preservada, transportada e, posteriormente, utilizada com fins de 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. Subseqüentemente, foi adicionado 20 µL do purificador Oragene a 500 µL da amostra de saliva em um tubo eppendorf utilizou-se o vortex por alguns 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 min a 13.000 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 min para a visualização da “nuvem” de DNA. Para a finalização do processo, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 13.000 g e logo após foi removido o sobrenadante de cada

amostra e foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  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 baseando-se na absorção de energia radiante (luz) através da utilização do espectrofotômetro *ThermoSpectronic Genesys 10 UV*. As medições foram realizadas em 260 nm e 280 nm, sendo que em 260nm a luz é absorvida pelo DNA e, em 280nm, pelas proteínas contidas na solução. Para cada amostra analisada, foi diluído 10  $\mu\text{L}$  de DNA purificado em 90  $\mu\text{L}$  de água milli-Q e colocados em uma cubeta apropriada para medição em espectrofotômetro. A concentração de DNA foi dada em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , através do cálculo  $A_{260} \times 10$  (fator de diluição)  $\times 50$  (fator de conversão) (SALGUEIRO *et al.*, 2002). Dessa forma, a relação absorvância de 260nm/280nm fornece um parâmetro de qualidade do DNA, também 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. Nas análises realizadas, foi encontrada uma média de 2,2 para a razão de pureza, sendo esse valor dentro do ideal para análise. A média de DNA foi igual a 151,5  $\text{ng}/\mu\text{L}$  o que caracteriza uma boa quantidade de DNA, uma vez que a ideal para a amplificação do trecho de DNA de interesse para a realização dos experimentos é em torno de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .



#### 4.5. Amplificação pelo método PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Reação da polimerase em cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction* - PCR) é um método de criação de múltiplas cópias de um trecho de interesse do DNA. Para isso, o DNA é extraído, e a este é adicionada uma mistura que contém os dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com um três fosfatos, os *primers* (iniciadores) e a enzima DNA polimerase. Essa mistura é encontrada pronta no mercado para uso em experimentos científicos. Em seguida, a mistura do DNA com os elementos de amplificação são colocados em um termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos, com tempos exatos específicos para cada reação, dependendo do tamanho e das características químicas do fragmento a ser amplificado.

Na primeira etapa do ciclo do PCR, a temperatura é elevada de 94 a 96°C por pouco tempo para que haja a separação da dupla cadeia de DNA (Desnaturação). Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre 50 a 60°C, dependendo da quantidade de C e G encontrada no fragmento, para que os *primers* se pareiem com a fita molde de DNA (Anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72°C para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (Extensão). Em seguida, um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação, na qual a taxa de replicação é exponencial.

Neste estudo, as reações para a amplificação foram preparadas através do kit *PCR Mastermix* da Promega® contendo 50 unidades por mL de Taq Dna polimerase, 400 µM de: dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. Adicionou-se a 12,5 µL (1X) do

Kit, 2,5 µL de *primer R* a concentração de 10µM e 2,5 µL de *primer F* também a 10 µM, mais a quantidade de DNA e H<sub>2</sub>O de acordo com a quantidade encontrada de DNA em cada amostra, totalizando 25 µL de reação para a amplificação. A tabela 1 mostra as condições físicas as quais cada gene passou pra ter seu fragmento de interesse amplificado. Na tabela 2 estão descritas as seqüências dos primers utilizados na reação de PCR dos genes de estudo.

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

<b>Genes</b>	<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão Final</b>	<b>Ciclos</b>
XRCC1	94°C / 4'	94°C / 1'	58°C / 50''	72°C / 45''	72°C / 5'	35
XPD	94°C / 4'	94°C / 1'	65°C / 30''	72°C / 45''	72°C / 5'	35

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

<b>Locus</b>	<b><i>Forward Primer</i></b>	<b><i>Reverse Primer</i></b>
XRCC1	5'-TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA-3'	5'-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3'
XPD	5'-CCCCTCTCCCTTTCCCTCTGTT-3'	5'-GCTGCCTTCTCCTGCGATTA-3'

#### 4.6. Polimorfismo no comprimento de fragmentos de Restrição - RFLP

RFLP é entendido por polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. O princípio por trás da tecnologia baseia-se na possibilidade de comparação de perfis de bandas gerados após a digestão com enzimas de restrição em moléculas de DNA de diferentes indivíduos. Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas. Após a quebra do DNA com as enzimas de restrição, há a separação dos fragmentos gerados, por eletroforese, o que corresponde a padrões de restrição específicos.

Os fragmentos dos genes amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição específicas de cada gene. Como pode ser observado na tabela 3, para o gene XRCC1 utilizou-se a enzima *MspI* (*HpaII* – *Fermentas-Brasil*), que tem como região de corte a seqüência 5'-C↓CGG-3'; para o gene XPD a enzima utilizada foi a *PstI* (*Fermentas-Brasil*), com a seqüência de corte 5'-CTGCA↓G-3'.

Tabela 3 - Genes e suas enzimas de restrições correspondentes

Gene alvo	Tipo de polimorfismo	Técnica
XRCC1	Arg399Gln	PCR-RFLP ( <i>MspI</i> )
XPD	Lys751Gln	PCR-RFLP ( <i>PstI</i> )

Na análise por RFLP, a amostra de DNA é digerida em pedaços por enzimas de restrição e os fragmentos de restrição resultantes são separados de acordo com seus tamanhos através de eletroforese em gel de agarose. A tabela 4 mostra os tamanhos dos fragmentos dos genes de estudo (XRCC1 e XPD).

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

<b>Gene alvo</b>	<b>RFLP</b>	<b>Genótipo</b>
XRCC1	615pb	Gln-Gln
	221 e 374 pb	Arg-Arg
	221, 374 e 615pb	Gln-Arg
XPD	272pb	Lys-Lys
	86 e 186pb	Gln-Gln
	86, 186 e 272pb	Lys-Gln

A figura 7 exemplifica a técnica por RFLP. Na primeira coluna encontra-se o marcador de peso molecular, que varia de 1000pb a 100pb. A segunda é uma amostra amplificada não cortada (controle). Da terceira à nona colunas estão amostras de DNA de diferentes indivíduos recortadas com a enzima de restrição. Nota-se que o DNA foi dividido em duas bandas, quando homozigotos (3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> colunas) e em três, quando heterozigotos (5<sup>a</sup> coluna). Na 8<sup>a</sup> coluna encontra-se uma amostra que não foi

digerida pela enzima de restrição, resultando em uma única banda de DNA (homozigoto selvagem).

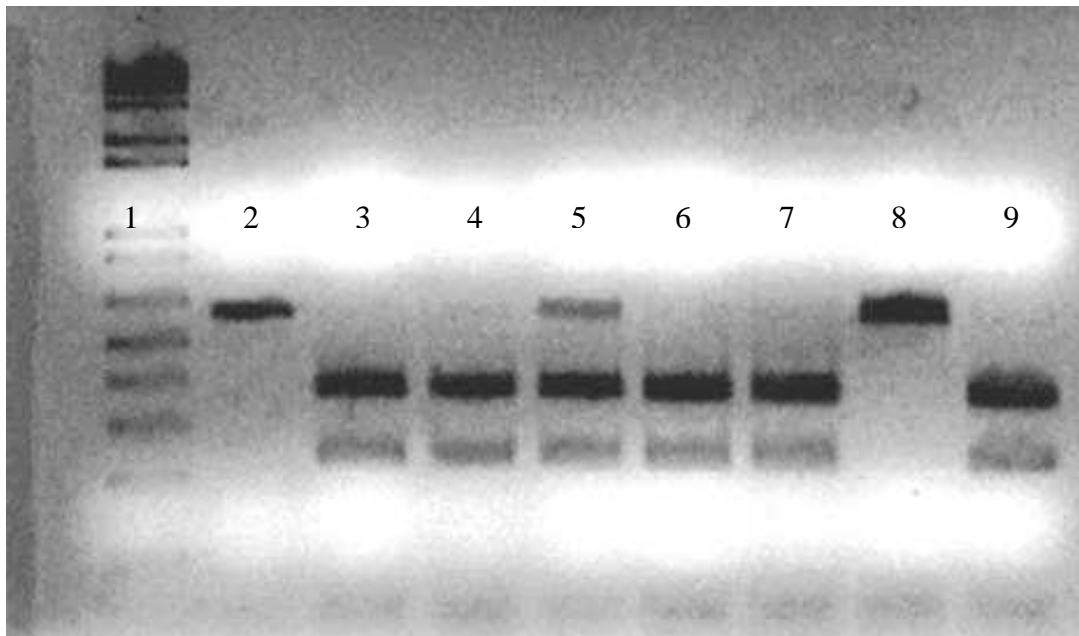


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose de amostras digeridas com a enzima de restrição MspI para o gene XRCC1.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Quantificação de DNA**

A quantidade e a pureza do DNA genômico obtido foram satisfatórias para a realização do PCR e das análises por RFLP. Foram encontradas em mais de 98% das amostras razões (260nm/280nm) acima de 1,6. A média das leituras das absorvâncias 260/280 ficou em torno de 2,35. A concentração de DNA obtido do material extraído com o Kit *Oragene* apresentou rendimento médio de 150 ng/ $\mu$ L.

O número de amostras com qualidade de extração de material genético, e com condições para o corte de enzima de restrição foi de 78 indivíduos para o gene XRCC1 e 79 para XPD, que representa cerca 90% de rendimento das amostras recolhidas da população de Monte Alegre.

### **5.2. Frequências alélicas**

A análise das frequências alélicas foi realizada para a verificação do número de alelos polimórficos na região. Posteriormente, essa frequência deve ser comparada a dados encontrados na literatura. Dessa forma, pode-se investigar como determinado polimorfismo está se comportando dentro de uma população: se ele está tendendo ao desaparecimento ou se está se expandindo na população.

O quadro 1, que se encontra no anexo II, apresenta os dados dos indivíduos com idade e sexo identificados. Um grupo foi mais exposto (tercil 3) e outro menos exposto (tercil 1) e também foi identificada a presença ou não de polimorfismos nos alelos dos genes em estudo. Ao ser encontrado polimorfismo em um alelo, classificou-se esse grupo de pessoas como sendo heterozigotos (Hetero). Quando há polimorfismo nos dois alelos, nomeou-se de homozigotos variantes (Homo var). No caso em que os dois alelos são normais (não polimórficos), os indivíduos foram classificados como Homo wt (homozigotos tipo selvagem -*wild type*). O “x” representa amostras de DNA que não amplificaram pelo método PCR, não apresentando nenhum resultado visível. Isto pode se dever a vários fatores que influenciam no resultado final da extração e amplificação do DNA, como alto grau de impurezas, erros na manipulação das amostras, problemas no armazenamento das amostras e até quantidade insuficiente de amostra (saliva) para a extração do DNA da mesma.

A tabela 5 abaixo é o resultado das análises dos dados encontrados no quadro 1 (anexo II). Ela apresenta, em números percentuais, as frequências dos alelos polimórficos e não polimórficos nos genes XRCC1 e XPD.

Tabela 5 - Frequências nos alelos dos genes de estudo

<b>Genes</b>	<b>Não Polimórfico</b>	<b>Polimórfico</b>
XRCC1	34,6%	65,4%
XPD	67,7%	32,9%

### 5.3. Frequência Genotípica

O genótipo predominante no caso dos dois genes estudados foi o heterozigoto. A Tabela 6 mostra as frequências dos genótipos dos genes de estudo na amostra total da população.

Tabela 6 – Frequências dos genótipos dos genes de estudo na população total

<b>Frequência Genotípica</b>		
	<b>XRCC1</b>	<b>XPB</b>
<b>Homozigoto wt</b>	9 (12%)	32 (40,5%)
<b>Heterozigoto</b>	36 (46%)	43 (54,4%)
<b>Homozigoto Variante</b>	33 (42%)	4 (5,1%)
<b>Total de indivíduos</b>	78	79

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 a fatores de risco externo para câncer e da frequência genotípica por doenças na população.



Para relacionar os fatores (tercil de exposição, sexo, idade, etc.) com a incidência de algum dos polimorfismos, utilizou-se o teste de Fisher com o auxílio do programa estatístico STATA/ SE 8.0 para Windows. O Teste de Fisher examina a significância da associação (contingência) entre dois tipos de classificação (polimorfismo x sexo, por exemplo). Os valores de significância (*p-Value*) indicam quando há uma associação significativa entre as variáveis. Se o valor de *p* for menor do que 0,05, a associação é significativa.

### **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. A tabela 7 apresenta a frequência genotípica entre os sexos (masculino e feminino). Os resultados mostram que a frequência genotípica não difere entre os sexos para cada gene estudado: XRCC1 e XPD (*p-value* = 0,176 e 0,342, respectivamente).

Tabela 7 – Análise das frequências por sexo dos genes estudados

<b>XRCC1</b>				
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>	<b>Total</b>
<b>Feminino</b>	7 (14,9%)	18 (38,3%)	22 (46,8%)	47
<b>Masculino</b>	2 (6,7%)	18 (60,0%)	10 (33,3%)	30
<i>p-value</i>		0,176		
<b>XPD</b>				
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>	<b>Total</b>
<b>Feminino</b>	21 (42,9%)	27 (55,1%)	1 (2,0%)	49
<b>Masculino</b>	11 (36,7%)	16 (53,3%)	3 (10,0%)	30
<i>p-value</i>		0,342		

O levantamento da frequência genotípica dos indivíduos de acordo a idade também foi realizado e está exposto na Tabela 8. Durante o preenchimento dos questionários, quatro indivíduos não revelaram a idade. Para a análise do parâmetro idade, a população foi dividida em duas faixas: indivíduos com até 40 anos (<40) e indivíduos acima de 40 anos (≥40).

Tabela 8 - Análise das frequências por idade\* dos genes estudados

<b>XRCC1</b>			
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>
<b>&lt;40 anos</b>	5 (6,8%)	21 (28,4%)	18 (24,3%)
<b>≥40 anos</b>	2 (2,7%)	13 (17,6%)	15 (20,3%)
<b><i>p-value</i></b>		1.000	
<b>Total de indivíduos com idade determinada: 74</b>			
<b>XPD</b>			
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>
<b>&lt;40 anos</b>	16 (21,6%)	27 (36,5%)	1 (1,4%)
<b>≥40 anos</b>	15 (20,3%)	13 (17,6%)	2 (2,7%)
<b><i>p-value</i></b>		0,164	
<b>Total de indivíduos com idade determinada: 74</b>			

\*4 indivíduos com idade não determinada

### **5.3.2. Frequência genotípica entre grupos populacionais expostos a fatores de risco 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, hábito de fumar e área onde reside (rural ou urbana). Desta forma, poder-se-ia sugerir uma maior vigilância epidemiológica nos grupos que apresentassem maior frequência de polimorfismos em situações de maior risco que, conseqüentemente, estariam mais suscetíveis ao desenvolvimento de um câncer.

Nos fumantes, não foi encontrada nenhuma correlação estatística do hábito de fumar com a presença dos polimorfismos dos genes XRCC1 e XPD (*p-value* = 1,000 e 0,104, respectivamente).

Já o estudo da área de residência, houve correlação estatisticamente significativa entre este fator e o polimorfismo de XRCC1, como pode ser observado na tabela 9. Isto significa que há um maior número de pessoas que apresentam algum polimorfismo e que residem na área rural do município. No entanto, quando correlacionamos essa área com os tercís de exposição, não encontramos relação (*p-value* = 1,000), ou seja, não há maior número de indivíduos mais expostos que vivem na área rural.

Tabela 9 - Frequências genotípicas nas áreas de residência

<b>XRCC1</b>				
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>	<b>Total</b>
<b>Área urbana</b>	7 (20,6%)	16 (47,0%)	11 (32,4%)	34 (60,0%)
<b>Área rural</b>	0	7 (30,4%)	16 (69,6%)	23 (40,0%)
<i>p-value</i>	0,007*			
<b>XPD</b>				
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>	<b>Total</b>
<b>Área urbana</b>	16(44,4%)	19 (52,8%)	1(2,8%)	36 (60,0%)
<b>Área rural</b>	7 (29,2%)	15 (62,5%)	2 (8,3%)	24 (40,0%)
<i>p-value</i>	0,376			

\*Valor estatisticamente significante

Na tabela 10, observa-se a distribuição da frequência genotípica pelos nos indivíduos menos expostos (tercil 1) mais expostos (tercil 3).

Tabela 10 – Frequências genotípicas e seu percentual nos tercís

<b>XRCC1</b>				
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>	<b>Total</b>
<b>Tercil 1</b>	3 (8,0%)	19 (50,0%)	16 (42%)	38 (49%)
<b>Tercil 3</b>	6 (15%)	17 (42,5%)	17 (42,5%)	40 (51%)
<i>p-value</i>		0,624		

<b>XPB</b>				
	<b>Homozigoto wt</b>	<b>Heterozigoto</b>	<b>Homozigoto variante</b>	<b>Total</b>
<b>Tercil 1</b>	15 (39,5%)	23 (60,5%)	0	38 (48%)
<b>Tercil 3</b>	17 (41,5%)	20 (48,8%)	4 (9,7%)	41 (52%)
<i>p-value</i>		0,342		

### 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, gota, reumatismo 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 para nenhuma das doenças estudadas.

Tabela 11 – Valor do p – Value para cada fator analisado

Fatores analisados	Valores de p	
	XRCC1	XPB
Artrite/gota/reumatismo	0,777	0,382
Hepatite	1,000	0,391

#### 5.4. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para analisar a frequência genotípica, utilizou-se a ferramenta do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). O HWE é a base da genética de populações. Foi demonstrado independentemente por Godfrey Harold Hardy na Inglaterra e por Wilhelm Weinberg, na Alemanha, em 1908. Afirma que, em uma população mendeliana, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. Independentemente de um gene ser raro ou frequente, sua frequência permanecerá a mesma com relação aos outros desde que essas condições sejam mantidas (CHEN *et al.*, 2009).

Os pressupostos para o equilíbrio Hardy-Weinberg são de que a população considerada é idealizada, ou seja, é infinita (ou efetivamente assim, no sentido de eliminar-se a deriva genética); está sob um regime de reprodução sexuada; os indivíduos acasalam-se aleatoriamente (sem seleção sexual ou desvio de aleatoriedade por dispersão geográfica); é diplóide; tem número de fêmeas igual ao número de machos; todos os casais são férteis e têm o mesmo número de prole; não sofre seleção natural, mutações e migração (sem fluxo genético). Quando os pressupostos de Hardy-Weinberg não são satisfeitos, ocorrem desvios das expectativas, mas dependendo de qual pressuposto não é satisfeito, esses desvios podem ou não ser estatisticamente detectáveis. Desvios podem ser causados por entrecruzamento, acasalamento não-aleatório, seleção, ou deriva genética.

O cálculo de HWE inclui a obtenção das frequências alélicas a partir das fórmulas a seguir (Fórmula 1). Uma vez que as frequências alélicas estão calculadas, parte-se para a expectativa de Hardy-Weinberg (Fórmula 2).

Fórmula 1– Fórmulas a partir das quais as frequências alélicas ( $p$  e  $q$ ) podem ser calculadas

$$p = \frac{2 \times \text{obs}(AA) + \text{obs}(Aa)}{2 \times (\text{obs}(AA) + \text{obs}(Aa) + \text{obs}(aa))}$$
$$q = 1 - p$$



Em que: “p” é a frequência do alelo polimórfico; “AA” o número de alelos Homozigotos wt; “Aa” o número de alelos Heterozigotos; “aa” o número de alelos Homozigotos variantes; “q” a frequência do alelo não polimórfico.

Fórmula 2 – Fórmula do calculo da expectativa de Hardy-Weinberg

$$\begin{aligned}\text{Exp}(AA) &= p^2n \\ \text{Exp}(Aa) &= 2pqn \\ \text{Exp}(aa) &= q^2n\end{aligned}$$

Em que: “n” é o número total de alelos da população

O teste do desvio do equilíbrio HWE é feito através do teste Chi-quadrado de Pearson, usando as frequências observadas dos genótipos obtidas dos dados e as frequências genotípicas esperadas obtidas usando-se o princípio HWE (Fórmula 3). Há um grau de liberdade. (Graus de liberdade para testes quadrados são normalmente  $n-1$ , onde  $n$  é o número de classes de genótipos). Neste caso, um grau de liberdade é perdido pelos valores esperados terem sido estimados a partir dos valores observados. Como o nível de significância é de 5% para 1 grau de liberdade (3,84), valores menores que isso não rejeitam a hipótese nula, ou seja, de que a população está em equilíbrio Hardy-Weinberg.

### Fórmula 3 - Teste Chi-quadrado de Pearson

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Em que: “O” é a frequência genotípica observada e “E” a frequência genotípica esperada.

Os genes estudados apresentaram comportamentos diferentes quando submetidos à análise pelo HWE. A frequência genotípica para o gene XPD não se encontrou dentro do equilíbrio, ao contrário do gene XRCC1, que apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#### 5.5. O cálculo da estimativa de incerteza

Para a realização dessas análises, o n de cada amostra foi utilizado para calcular a estimativa de incerteza na medida da frequência alélica de cada gene analisado através da fórmula  $N = \frac{4pq}{e^2}$ , para um nível de confiabilidade de 95%, em uma curva normal onde  $z=2$ . A variável “p” é o valor da frequência no alelo não polimórfico; “q” é o valor do alelo polimórfico e “e” é o estimativa da incerteza. Com isso achamos o valor do alelo **p** (não polimórfico) para o gene XRCC1 de 0,12 e para XPD de 0,68, enquanto

que o valor de  $q$  foi de 0,88 para XRCC1 e de 0,32 para XPD. A estimativa de incerteza encontrada foi de 10,75% para XRCC1 e 10,5% para XPD.

## 6. DISCUSSÃO

Caracterizações geológicas e alguns levantamentos radiométricos realizados 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 na região utilizando blocos de pedra contendo urânio, o que alertou para a importância do monitoramento dessa população (MELO *et al.*, 1999).

Estudos anteriores indicaram a possível associação entre casos de leucemia linfática 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).

A Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) recomenda que o nível de ação remediadora 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<sup>-3</sup>, respectivamente (ICRP, 1993, WRIXON *et al.*, 2008). Considerando, entretanto, os valores de dose segundo a ICRP, a concentração de radônio nas residências não ultrapassou os limites recomendados.

Quando se objetiva reduzir os níveis de radônio nas residências, a ICRP 65 sugere que o nível de intervenção para o radônio só se justificará com concentrações superiores a 600 Bq.m<sup>-3</sup> ou doses anuais de 10 mSv (ICRP, 1993). Algumas medições foram

realizadas em 2008 no município de Monte Alegre e as doses variaram, a região considerada com maior dose teve uma média de 4 mSv por ano, onde a maior dose encontrada nesta região foi de 8 mSv e a de menor em torno de 3 mSv (MELO, 2009). Estes valores representam menos da metade do valor mínimo recomendado para a intervenção radiológica.

Uma explicação para um possível aumento da incidência de câncer em Monte Alegre estaria relacionada a uma maior susceptibilidade genética e/ou predisposição familiar ao desenvolvimento do câncer. No entanto, a taxa de mortalidade por câncer em Monte Alegre não é maior que o esperado para a região norte do Brasil no Estado do Pará, onde a população de estudo está localizada (MELO *et al.*, 2009).

Os dados de frequência genotípica gerados a partir deste estudo se mostram em discordância com dados encontrados na literatura, no que se diz respeito ao gene XRCC1. Neste gene, a frequência de genótipo não polimórfico foi de 34,6%, enquanto que o polimórfico foi de 65,4%. Na literatura (YAN *et al.*, 2009, GENG *et al.*, 2009), os dados encontrados revelam uma frequência genotípica de alelos polimórficos em torno de 30%. No entanto, as frequências dos alelos geralmente seguem padrões de etnia, raciais e/ou geográficos (YAN *et al.*, 2009). Dessa forma, acredita-se que essa alta frequência polimórfica do gene XRCC1 esteja seguindo algum desses padrões na população de Monte Alegre, uma vez que a taxa de mortalidade por câncer aí encontrada está dentro dos padrões regionais. O gene XRCC1 é um dos genes de reparo de DNA e está envolvido com o reparo das bases danificadas e com as quebras de fita simples de DNA (LOIZIDOU *et al.*, 2008).

Quando submetidos ao HWE, os dados de frequência alélica do gene XRCC1 se apresentaram dentro do equilíbrio pressuposto no teorema. Isso é indicativo de que a população não está sujeita à pressão de seleção, ao fluxo de migração e à mutação. Esses fatores podem ser considerados, neste caso, desprezíveis e, por isso, fatores evolutivos não estão interferindo na frequência deste gene.

A frequência genotípica do gene XRCC1 também foi submetida ao teste de Fisher em comparação com diversas variáveis: sexo, idade, tercil de exposição, fumo, área residencial, artrite, hepatite e câncer. Somente a variável “área rural” apresentou relação estatisticamente significativa com a presença do polimorfismo estudado. Quando correlacionados aos tercis de exposição, os polimorfismos não foram maiores no grupo mais exposto, ou seja, não há mais polimorfismos nos indivíduos mais expostos. Isso sugere que não há necessidade de uma maior vigilância epidemiológica nessa população. Sugere-se que a maior frequência de polimorfismos no gene XRCC1 pode estar ligada a uma menor mobilidade da população rural, ocasionando um maior cruzamento consanguíneo das pessoas que lá residem, mantendo a frequência do polimorfismo alta. As demais variáveis avaliadas não apresentaram relação com a presença ou não do polimorfismo neste gene.

O gene XPD é um dos genes que atua no reparo por excisão de bases do DNA. Ele codifica uma proteína com função de helicase, e o polimorfismo de XPD pode influenciar na capacidade de reparo de DNA. Este estudo revelou que o grupo amostral analisado possui uma frequência genotípica de polimorfismo em torno de 33%, enquanto que na literatura é descrita uma frequência em torno de 40% (MOCELLIN *et*

*al.*, 2009). Considerando-se a incerteza associada à análise do presente estudo, o resultado encontrado é coerente com os dados descritos na literatura.

A frequência de polimorfismo para o gene XPD se encontrou em desequilíbrio de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg. Este teorema não é simplesmente uma lei teórica: qualquer desacordo com a lei pode ser sinal de problemas importantes, erros ou peculiaridades nos dados analisados (SALANTI *et al.*, 2005). No entanto, o Equilíbrio Hardy-Weinberg é uma aproximação, pois suas premissas são raramente encontradas nas populações humanas, além de uma grande amostra ser necessária para atender ao “requerimento” de população infinita. Os desvios podem ser devido a fatores intrínsecos à população, como mutações ao acaso, casamentos consanguíneos, população pequena, estratificações e seleção na população. Um outro viés é o erro na genotipagem, o que pode dar indícios da necessidade de repetição ou re Checagem dos experimentos.

Assim com para os dados do gene XRCC1, XPD também foi submetido ao teste de Fisher. Nenhuma das variáveis avaliadas tinha relação com a presença ou não do polimorfismo neste gene.

A radiação natural do município de Monte Alegre pode ser considerada como um efeito indutor de quebras de fita de DNA. Por essa razão, foi realizada a análise da correlação da presença dos diversos polimorfismos estudados nos genes XRCC1 e XPD na susceptibilidade genotóxica dos indivíduos expostos ao urânio. O resultado encontrado não invalida a contribuição dos genótipos polimórficos na variabilidade interindividual e possível susceptibilidade ao câncer induzido pelas radiações ionizantes

de origem natural. A influência desses polimorfismos, os quais estão envolvidos no reparo do DNA e na genotoxicidade induzida pela RI depende da dose de exposição.



## 7. CONCLUSÃO

As radiações ionizantes interagem com as moléculas biológicas, podendo causar danos em potencial. As células, no entanto, possuem mecanismos para reparar tais danos, principalmente quando se trata da molécula de DNA, a qual carrega toda a informação necessária para o desenvolvimento e sobrevivência dos organismos.

Quando os sistemas de reparo ficam comprometidos, os danos no DNA podem ser propagados e transmitidos às gerações celulares seguintes. Os polimorfismos em genes de reparo do genoma são grandes responsáveis pela falha no reparo, uma vez que dão origem a proteínas defeituosas e, muitas vezes, não funcionais. Dessa forma, a combinação dos fatores polimorfismo e radiações ionizantes podem levar os indivíduos a uma maior susceptibilidade genética à mutações, defeitos no genoma e, conseqüentemente, ao câncer.

Uma amostra da população de Monte Alegre foi analisada, neste estudo, quanto à sua frequência de polimorfismo para os genes XRCC1 e XPD, ambos relacionados à manutenção da estabilidade do genoma. Os resultados demonstraram que, para o gene XRCC1, há uma frequência polimórfica aumentada nesta população, apesar de não ter sido encontrada nenhuma correlação com casos de câncer. Para o gene XPD, a frequência polimórfica estava condizente com relatos da literatura. Neste caso, também não houve correlação com casos de câncer.

Dos genes analisados, o gene XPD não se encontrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Acredita-se que isto se dá a fatores como a mutação ao acaso e o tamanho da população que podem estar interferindo na genética da população.

Enfim, este estudo realizou a caracterização genotípica em genes relacionados a manutenção da estabilidade do genoma de uma população residente em uma área de radioatividade natural elevada.

A partir dessa caracterização, podemos avaliar a influência de fatores moleculares que podem aumentar a susceptibilidade ao câncer desta população quando exposta a níveis aumentados de radiação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMABILE, J. Multifactorial study of the risk of lung cancer among French uranium miners: radon, smoking and silicosis. *Health Phys* [S.I.], v. 97, n. 6, p. 613-21, Dec 2009.
- AMARAL, E.C.S., Modificação da Exposição à Radiação Natural devido a Atividades Agrícolas e Industriais numa Área de Radioatividade Natural Elevada no Brasil. Tese de Doutorado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1992.
- AXELSON, O. Leukemia in childhood and adolescence and exposure to ionizing radiation in homes built from uranium-containing alum shale concrete. *Epidemiology* [S.I.], v. 13, n. 2, p. 146-50, Mar 2002.
- BANERJEE, M. Polymorphism in the ERCC2 codon 751 is associated with arsenic-induced premalignant hyperkeratosis and significant chromosome aberrations. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 28, n. 3, p. 672-6, Mar 2007.
- BARATA-VALLEJO, S. Radiation chemical studies of methionine in aqueous solution: understanding the role of molecular oxygen. *Chem Res Toxicol* [S.I.], v. 23, n. 1, p. 258-63, Jan 2010.
- BARCINSKI, M. Cytogenetic investigation in a Brazilian population living in an area of high natural radioactivity. *Am J Hum Genet* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 802-6, Nov 1975.
- BECK, B. XPB and XPD between transcription and DNA repair. *Adv Exp Med Biol* [S.I.], v. 637, p. 39-46, 2008.

- BELLI, M. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res (Tokyo)* [S.I.], v. 43 Suppl, p. S13-9, Dec 2002.
- BENHAMOU, S.; SARASIN, A. ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* [S.I.], v. 161, n. 1, p. 1-14, Jan 2005.
- BERWICK, M.; VINEIS, P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* [S.I.], v. 92, n. 11, p. 874-97, Jun 2000.
- BOITEUX, S., RADICELLA, J. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 377, n. 1, p. 1-8, May 2000.
- BRANDOM, W.F., SACCOMANNO, G., ARCHER, V.E., ARCHER, P.G., BLOOM, A.D., Chromosome aberrations as a biological dose-response indicator of radiation exposure in uranium miners. *Radiat Res*, 76:159-171. 1978.
- CAGGANA, M. Associations between ERCC2 polymorphisms and gliomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 355-60, Apr 2001.
- CALDECOTT, K. Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 23, n. 23, p. 4836-43, Dec 1995.
- CALDECOTT, K. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* [S.I.], v. 9, n. 8, p. 619-31, Aug 2008.
- CARDIS E. Commentary on information that can be drawn from studies of areas with high levels of natural radiation. In Proc. of 6th International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas. Kinki University, Osaka, Japan. *International Congress Series* 1276:118-123, 2005.

- CESAR, C.L.G., CARANDINA, L., ALVES, M.C.G.P, BARROS, M.B.A, GOLDBAUM, M., Saúde e condição de vida em São Paulo. Inquérito multicêntrico de saúde no Estado de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da USP. 212p. 2005.
- COSTA, S. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. *Breast Cancer Res Treat* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 209-17, Jun 2007.
- CULLEN, T.L., Review of the Brazilian investigations in areas of high natural radioactivity, Part I: radiometric and dosimetric studies. *In Proceedings of the International Symposium on High Natural Radioactivity, Poços de Caldas, Brazil, 20 junho 1975*, eds. T.L. 1977.
- CHEN, A. [Influential factors of Hardy-Weinberg equilibrium on the study of association between gene polymorphism and disease.]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* [S.I.], v. 30, n. 11, p. 1203-6, Nov 2009.
- CHEN, D.; WEI, L. Chromosome aberration, cancer mortality and hormetic phenomena among inhabitants in areas of high background radiation in China. *J Radiat Res (Tokyo)* [S.I.], v. 32 Suppl 2, p. 46-53, Dec 1991.
- CHEN, S. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 23, n. 8, p. 1321-5, Aug 2002.
- DARBY, S, HILL, D., DEO, H., AUVIEN, A., BARROS-DIOS, J.M., BAYSSON, H., BOCHICCHIO, F.. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*; 330 (7485-8223), 2005.
- DE BOER, J. Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutat Res* [S.I.], v. 509, n. 1-2, p. 201-10, Nov 2002.

- DELIPETAR-GRUDL, A.; GETOFF, N. Radiation-induced sensitizing effect of folic acid (vitamin B11) and its synergistic action to mitomycin C: in vitro experiments and radiolysis. *Oncol Res* [S.I.], v. 14, n. 11-12, p. 559-66, 2004.
- DOETSCH, P.; CUNNINGHAM, R. The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutat Res* [S.I.], v. 236, n. 2-3, p. 173-201, 1990 Sep-Nov 1990.
- DUELL, E. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 21, n. 5, p. 965-71, May 2000.
- FORD, B. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 21, n. 11, p. 1977-81, Nov 2000.
- FRIEDBERG, E. Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. *Trends Biochem Sci* [S.I.], v. 20, n. 10, p. 381, Oct 1995.
- GENE TESTS: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1993-2010. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed date of access: 10/2009.
- GENG, J. XRCC1 genetic polymorphism Arg399Gln and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Urology* [S.I.], v. 74, n. 3, p. 648-53, Sep 2009.
- GOODE, E. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [S.I.], v. 11, n. 12, p. 1513-30, Dec 2002.
- GREENLEE, R. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* [S.I.], v. 51, n. 1, p. 15-36, 2001 Jan-Feb 2001.
- HADA, M.; GEORGAKILAS, A. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res (Tokyo)* [S.I.], v. 49, n. 3, p. 203-10, May 2008.
- HARMS, C. Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer. *Environ Mol Mutagen* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 74-82, 2004.

- HASHIMOTO, S.; EGLY, J. Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. *Hum Mol Genet* [S.I.], v. 18, n. R2, p. R224-30, Oct 2009.
- HOEIJMAKERS, J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* [S.I.], v. 411, n. 6835, p. 366-74, May 2001.
- IARC- International Agency for Research on cancer. Monographson the evaluation of the carcinogenic risk to Humans Volume 78 Ionizing Radiation, Part 2: Some Internally Deposited Radionuclides. IARC Press: Lyon 2001
- IBGE, “Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais”. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. 2008.
- ICRP. Protection Against Radon-222 at Home and at Work. ICRP publication 65. Pergamon press, Oxford. 1993.
- IMANAKA, T. External radiation in Dolon village due to local fallout from the first USSR atomic bomb test in 1949. *J Radiat Res (Tokyo)* [S.I.], v. 47 Suppl A, p. A121-7, Feb 2006.
- IMPROTA, G. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of lung and colorectal cancer: a case-control study in a Southern Italian population. *Anticancer Res* [S.I.], v. 28, n. 5B, p. 2941-6, 2008 Sep-Oct 2008.
- KISH, L. SAMPLING ORGANIZATIONS AND GROUPS OF UNEQUAL SIZES. *Am Sociol Rev* [S.I.], v. 30, p. 564-72, Aug 1965.
- KNOX, E.G., STEWART, A.M., GILMAN C. Background radiation and childhood cancer. *J. Radiological Protection*,; 8:9-18. 1988.
- KRESTININA, L. Protracted radiation exposure and cancer mortality in the Techa River Cohort. *Radiat Res* [S.I.], v. 164, n. 5, p. 602-11, Nov 2005.

- KREWSKI, D. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 137-45, Mar 2005.
- LEHMANN, A. XPD structure reveals its secrets. *DNA Repair (Amst)* [S.I.], v. 7, n. 11, p. 1912-5, Nov 2008.
- LEHMANN, A. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* [S.I.], v. 15, n. 1, p. 15-23, Jan 2001.
- LEIBELING, D. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol* [S.I.], v. 37, n. 5-7, p. 225-38, Sep 2006.
- LIANG, G. Sequence variations in the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* [S.I.], v. 105, n. 5, p. 669-73, Jul 2003.
- LIMA, W.C., MEDINA-SILVA, R., GALHARDO, R.S., MENCK, C.F.M.. Distribution of DNA repair-related ESTs in sugarcane. *Genet. Mol. Biol.* vol.24, n.1-4, pp. 141-146. ISSN 1415-4757, 2001.
- LITTLE, J. Genomic instability and radiation. *J Radiol Prot* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 173-81, Jun 2003.
- LIU, G. Differential association of the codon 72 p53 and GSTM1 polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* [S.I.], v. 61, n. 24, p. 8718-22, Dec 2001.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. "Análise genética em biologia molecular." p.255-93. 2002.
- LOIZIDOU, M. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res Treat* [S.I.], v. 112, n. 3, p. 575-9, Dec 2008.



- LUBIN, J. Risk of lung cancer and residential radon in China: pooled results of two studies. *Int J Cancer* [S.I.], v. 109, n. 1, p. 132-7, Mar 2004.
- MANUGUERRA, M. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* [S.I.], v. 164, n. 4, p. 297-302, Aug 2006.
- MATULLO, G. Combination of DNA repair gene single nucleotide polymorphisms and increased levels of DNA adducts in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [S.I.], v. 12, n. 7, p. 674-7, Jul 2003.
- MATULLO, G. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* [S.I.], v. 92, n. 4, p. 562-7, May 2001.
- MCCARTY, K. Polymorphisms in XPD (Asp312Asn and Lys751Gln) genes, sunburn and arsenic-related skin lesions. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 28, n. 8, p. 1697-702, Aug 2007.
- MCDIARMID, M. Depleted uranium and public health. *BMJ* [S.I.], v. 322, n. 7279, p. 123-4, Jan 2001.
- MELO, L. R. "Mortality and cancer incidence among residents in an area with a geological occurrence of uranium: the municipality of Monte Alegre, PA, Brazil." 2009.
- MELO, V. Avaliação da concentração do  $^{222}\text{Rn}$  nos ambientes internos e externos das residências do município de Monte Alegre, PA - Tese de mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1999.
- MOCELLIN, S. DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 30, n. 10, p. 1735-43, Oct 2009.

- MOMBELLO, A. Quantitative study of ductal breast cancer progression: nuclear signatures for evaluation of progression grade. *Adv Clin Path* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 59-70, Jul 2001.
- MONACO, R. Conformational effects of a common codon 751 polymorphism on the C-terminal domain of the xeroderma pigmentosum D protein. *J Carcinog* [S.I.], v. 8, p. 12, 2009.
- MORT, R. Lack of involvement of nucleotide excision repair gene polymorphisms in colorectal cancer. *Br J Cancer* [S.I.], v. 89, n. 2, p. 333-7, Jul 2003.
- NRC. National Research Council. 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. 1988.
- PASTANA, S. M. N. 1999. Síntese geológica e favorabilidade para tipos de jazimentos minerais do Município de Monte Alegre-PA. Belém, *CPRM/PRIMAZ*. 34p
- PENNA FRANCA, E., ALMEIDA, J.C., BECKER, J., EMMERICH, M., ROSER, F.X., KEGEL, GUNTER, HAINSBERGER, L., CULLEN, T.L, PETROW, H. DREW, R. AND EISENBUD, M. *Status of Investigations In The Brazilian Areas of High Natural Radioactivity*. Health Physics, 11, 699-712. 1965.
- PORTO ALVES, M.; SILVA, N. [Variance estimation methods in samples from household surveys]. *Rev Saude Publica* [S.I.], v. 41, n. 6, p. 938-46, Dec 2007.
- PRESTON, D.L, CULLINGS, H., SUYAMA, A., FUNAMOTO, S., NISHI, N., SODA, M., PRICE, E.A., BOURNE, S.L., RADBOURNE, R., LAWTON, P.A., LAMERDIN, J., THOMPSON, L.H., ARRAND, J.E. Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 associated with câncer in patients of varying radiosensitivity, *Somat Cell Mol. Genet*. 23, pp. 237-247. 1997.

- PRESTON, D. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors exposed in utero or as young children. *J Natl Cancer Inst* [S.I.], v. 100, n. 6, p. 428-36, Mar 2008.
- QIAO, Y. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 295-9, Feb 2002.
- RATNASINGHE, L. Polymorphisms of XRCC1 and risk of esophageal and gastric cardia cancer. *Cancer Lett* [S.I.], v. 216, n. 2, p. 157-64, Dec 2004.
- REINERS, C. *et al.* Thyroid cancer in infants and adolescents after Chernobyl. *Minerva Endocrinol* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 381-95, Dec 2008.
- RERICHA, V. Incidence of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma in Czech uranium miners: a case-cohort study. *Environ Health Perspect* [S.I.], v. 114, n. 6, p. 818-22, Jun 2006.
- RON, E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. *Radiat Res* [S.I.], v. 150, n. 5 Suppl, p. S30-41, Nov 1998.
- RUTTAN, C.; GLICKMAN, B. Coding variants in human double-strand break DNA repair genes. *Mutat Res* [S.I.], v. 509, n. 1-2, p. 175-200, Nov 2002.
- SAADAT, M.; SAADAT, I. Association between polymorphisms of XRCC1 and offspring sex ratio at births in families of female breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* [S.I.], v. 119, n. 2, p. 509-10, Jan 2010.
- SAK, S. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk. *BMC Genet* [S.I.], v. 8, p. 13, 2007.
- SALANTI, G. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet* [S.I.], v. 13, n. 7, p. 840-8, Jul 2005.

- SALGUEIRO, N.B. “Identificação De Mutações No Gene Da Dthidropirimidina Desidrogenase em Doentes com Carcinoma Colo-Rectal Implicações no Tratamento Com 5-Fluorouracil. 2002.
- SHEN, M. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* [S.I.], v. 58, n. 4, p. 604-8, Feb 1998.
- SLIWINSKI, T. Common polymorphisms in the XPD and hOGG1 genes are not associated with the risk of colorectal cancer in a Polish population. *Tohoku J Exp Med* [S.I.], v. 218, n. 3, p. 185-91, Jul 2009.
- SMITH, T. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett* [S.I.], v. 190, n. 2, p. 183-90, Feb 2003.
- STARY, A.; SARASIN, A. The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie* [S.I.], v. 84, n. 1, p. 49-60, Jan 2002.
- STURGIS, E. DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [S.I.], v. 128, n. 9, p. 1084-8, Sep 2002.
- THACKER, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* [S.I.], v. 219, n. 2, p. 125-35, Mar 2005.
- THOMPSON, L.; WEST, M. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res* [S.I.], v. 459, n. 1, p. 1-18, Feb 2000.
- UNSCEAR, “Effects of ionizing radiation United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation Report to the General Assembly”. 2006.
- UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly, with scientific annex. New York, United Nations sales publication E.88.IX.7, 1994.

- UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. *United Nations Sales Publication*, New York; 2. 2000.
- VEIGA, L.H.S., KOIFMAN, S. Pattern of cancer mortality in some Brazilian HBRA. In Proc. Of 6<sup>th</sup> International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas. Kinki University, Osaka, Japan. *International Congress Series* 1276; 110-113. 2005.
- VEIGA, L.H.S., SACHET, I., MELO, V., AMARAL, E.C.S., Brazilian areas of high background radiation – are they really High? In: *Proceeding of the 5<sup>th</sup> International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas: Radiation Dose and Health Effects; Munich, Germany, Sep 4-7. 2000.*
- VEIGA, L. Feasibility study for a long-term follow-up in a historical cohort of Brazilian coal miners. *J Radiol Prot* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 349-60, Sep 2007.
- VEIGA, L. Preliminary indoor radon risk assessment at the Poços de Caldas Plateau, MG-Brazil. *J Environ Radioact* [S.I.], v. 70, n. 3, p. 161-76, 2003.
- VODICKA, P. *et al.* Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 25, n. 5, p. 757-63, May 2004.
- WEBER, C. ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *EMBO J* [S.I.], v. 9, n. 5, p. 1437-47, May 1990.
- WEI, Q. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst* [S.I.], v. 92, n. 21, p. 1764-72, Nov 2000.

- WHITE, M. Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'→3' DNA helicases. *Biochem Soc Trans* [S.I.], v. 37, n. Pt 3, p. 547-51, Jun 2009.
- WRIXON, A. New ICRP recommendations. *J Radiol Prot* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 161-8, Jun 2008.
- WU, Y. Welcome the family of FANCI-like helicases to the block of genome stability maintenance proteins. *Cell Mol Life Sci* [S.I.], v. 66, n. 7, p. 1209-22, Apr 2009.
- YAMAGUCHI, N. Ultraviolet radiation and health: from hazard identification to effective prevention. *J Epidemiol* [S.I.], v. 9, n. 6 Suppl, p. S1-4, Dec 1999.
- YAN, L. Polymorphisms of XRCC1 gene and risk of gastric cardiac adenocarcinoma. *Dis Esophagus* [S.I.], v. 22, n. 5, p. 396-401, 2009.
- ZHANG, C. [Correlation of XPD gene with susceptibility to gastric cancer]. *Ai Zheng* [S.I.], v. 28, n. 11, p. 1163-7, Nov 2009.
- ZHOU, W. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Res* [S.I.], v. 62, n. 5, p. 1377-81, Mar 2002.
- ZIENOLDDINY, S. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 560-7, Mar 2006.

# ANEXO I: A CARACTERIZAÇÃO RADIOLÓGICA AMBIENTAL DA REGIÃO DE MONTE ALEGRE

## 1. Processo de amostragem

O método de amostragem das residências foi probabilística e estratificada por conglomerados em dois estágios: setor censitário e domicílio [1]. 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, Alenquer e Prainha utilizando a metodologia proposta por Porto Alves (2005) [2].

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 permitirá a realização de comparações com estudos realizados anteriormente em outros municípios do país [3].

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

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

em que:  $n_0$  = número de indivíduos (tamanho da amostra);  $P$  é a proporção de indivíduos a ser 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 e  $eff$  é o efeito de delineamento [1,4]

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

- nível de significância de 95% na determinação dos intervalos de confiança, correspondendo a  $z=1,96$ ;
- erro de amostragem de 15% ( $d=0,15$ ) relativo à diferença máxima aceitável entre a estimativa amostral e o parâmetro populacional;
- 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, obtém-se uma estimativa do tamanho da amostra que será de 85 pessoas por sub-grupo de sexo/faixa etária.

## **2. Caracterização radiológica ambiental**

Uma ampla caracterização radiológica ambiental da região de Monte Alegre, Prainha e Alenquer foi realizada através de algumas 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 a que a população de Monte Alegre, Prainha e Alenquer estão expostas.



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. Alguns detectores de trânsito serão utilizados como controle da exposição durante o trajeto. A concentração de radônio em cada residência foi dada em  $\text{Bq/m}^3$ .

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.

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 detectores de  $\text{LiF:Mg,Cu,P}$  e  $\text{LiF:Mg,Ti}$  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 foi dada pela taxa de kerma no ar em  $\mu\text{Gy h}^{-1}$ .

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. 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 foi registrada.

d) Determinação da concentração de atividade de radionuclídeos em água potável e alimentos mais consumidos na região;

Os principais produtos cultivados e consumidos na região foram analisados quanto à concentração de atividade de radionuclídeos naturais: U natural, Th-232, Ra-226, Ra-228 e Pb-210. Também foi analisada a água consumida pela população (água de abastecimento público e água de poço artesiano).

Amostras de alimentos cultivados na região foram coletados diretamente com os produtores. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Radioquímica do

Instituto de Radioproteção e Dosimetria, onde foram processadas para a análise radioquímica. O urânio total foi determinado por fluorimetria e o Th-232 por espectrofotometria com arsenazo III. Os isótopos de rádio foram determinados por contagem alfa e beta total do precipitado de Ba(Ra(SO<sub>4</sub>)), e o Pb-210 determinado, após precipitação como cromato, através do Bi-210 [5,6].

a) Estimativa da dose efetiva anual

A quantificação da exposição à radiação foi feita com base na dose efetiva comprometida das populações em estudo. A dose efetiva foi calculada considerando a exposição à radiação externa gama, a exposição ao radônio dentro de casa. Para a exposição intra-domiciliar ao radônio, a dose efetiva anual é dada por:

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

Em que: Dose efetiva (Rn)= Dose efetiva anual devido à exposição ao radônio dentro de casa (mSv/ano);  $C_{\text{Rn}}$  = Concentração de atividade média de radônio dentro de casa em Bq.m<sup>-3</sup>; Feq = Fator de Equilíbrio para radônio dentro de casa = 0,4; T = Numero de horas em 1 ano = 8760;  $F_{\text{oc}}$  = Fator de ocupação dentro de casa = 0,8 e  $\text{FCD}_{\text{Rn}}$  = Fator de conversão de dose para radônio = 6 nSv/Bq.h.m<sup>-3</sup>.

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

$$\text{Dose efetiva (gama)} = (\text{Kext} \cdot T \cdot \text{Foc-ext} \cdot \text{FCD}) + (\text{Kint} \cdot T \cdot \text{Foc-int} \cdot \text{FCD})$$

Em que: 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

Foc-ext = Fator de ocupação dentro de casa = 0,8

Foc-int = Fator de ocupação fora de casa = 0,2

FCD = Fator de conversão de dose para exposição externa gama = 0,7 Sv.Gy-1

Para a exposição interna devido à ingestão de água e alimentos cultivados na região, o cálculo da dose efetiva é dado por:

$$\text{Dose efetiva(ingestão)} = \sum C_{w,n} \cdot I_w \cdot FCD_{ig,n} + \sum C_{i,n} \cdot I_i \cdot FCD_{ig,n}$$

Em que:  $C_{w,n}$  é a concentração de atividade do radionuclídeo na água de beber (Bq/L)

$I_w$  é a taxa de ingestão anual de água (L/ano)

$C_{i,n}$  é a concentração de atividade do radionuclídeo n no alimento i (Bq/Kg)

$I_i$  é a taxa de ingestão do alimento i (Kg/ano)

$FCD_{ig,n}$  é o fator de conversão de dose por ingestão para o radionuclídeo n (Sv/Bq)

Outras vias de exposição poderiam ter sido consideradas como a exposição interna devido à ingestão de radônio dissolvido na água, a exposição externa devido a imersão água de rio, dose interna devido à ingestão de produtos de origem animal (leite e carne). No entanto, a contribuição das mesmas para a dose efetiva total é muito pequena, podendo ser considerada desprezível. Desta forma, o cálculo de dose para a população de Monte Alegre, Prainha e Alenquer foi devido principalmente a exposição ao radônio, exposição externa gama e ingestão de água e alimentos cultivados, sendo os dois primeiros os maiores contribuintes da dose devido à radiação natural.

A distribuição dos valores de dose efetiva foi estimada utilizando os valores de distribuição da concentração de radônio, a distribuição dos valores de taxa de kerma no ar e a distribuição dos valores dos parâmetros utilizados no modelo de cálculo de dose reportados na literatura. Esta estimativa foi realizada utilizando o software Crystal Ball (Decisioneering) de análise de incerteza paramétrica utilizando o método de Monte Carlo.

#### b) Avaliação da incidência de câncer e morbidade

Cada um dos domicílios sorteados no processo de amostragem foi visitado por um membro da equipe para a realização de entrevistas com cada morador, sendo as mesmas também realizadas em outra oportunidade caso fosse necessário.

As informações foram obtidas através de questionários validados aplicados pro entrevistadores, sendo respondidos diretamente pelos participantes ou pelos responsáveis de menores de 12 anos. Este incluiu informações referentes a composição familiar, condições de morbidade referida de 15 dias anteriores a entrevista e informações sobre a existência de diagnóstico de doenças crônicas (hipertensão, diabetes, câncer e outras).

#### Referências:

1. KISH, L., 1965. Survey sampling. New York: John Wiley & Sons
2. PORTO ALVES MC, SILVA NN. 2007. Variance estimation methods in samples from household surveys *Rev Saude Publica*. Dec;41(6):938-46.

3. 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.
4. MOMBELLO A, MARIUZZI L, MORELLI L, GRANCHELLI G, RUCCO V, TAROCCO E, DA SILVA VD, THOMPSON D, BARTELS HG, BARTELS PH, MARIUZZI G. 2001. Quantitative study of ductal breast cancer progression: nuclear signatures for evaluation of progression grade. *Adv Clin Path.* Jul;5(3):59-70.
5. GODOY, J.M. & SCHUTTLEKOPF, H.; 1987. Considerations about  $^{226}\text{Ra}$  gross alpha determination. *Journal Radioanal. Nucl. Chem.* 3 (2): 329-335.
6. GODOY, J.M.; 1983. Entwicklung einer analysenmethode für die bestimmung von  $^{238}\text{U}$ ,  $^{234}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{228}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{228}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  und  $^{210}\text{Po}$  and ihre Anwendung auf Umweltproben. Doktors der Naturwissenschaften Genehmigten Dissertation, Institut für Radiochimie, Technische Universität München.

## ANEXO II: Quadro 1

### Dados dos indivíduos analisados

Número coleta	Sexo	Tercil	XRCC1	XPB
1	F	1	hetero	homo wt
2	M	1	x	x
3	F	1	hetero	homo wt
4	M	1	hetero	hetero
5	F	1	hetero	hetero
8	M	1	hetero	homo wt
10	F	1	hetero	hetero
11	F	1	hetero	hetero
12	F	1	hetero	homo wt
13	M	1	hetero	hetero
14	F	1	homo wt	homo wt
15	F	1	homo var	homo wt
16	F	1	homo wt	hetero
17	M	1	hetero	homo wt
18	F	3	homo var	hetero
19	F	1	homo var	homo wt
20	F	1	homo wt	homo wt
21	M	1	hetero	x
22	F	1	homo var	hetero
23	M	1	hetero	homo wt
24	M	1	x	homo wt
25	F	1	homo var	homo wt
26	F	1	homo var	hetero
27	F	1	homo var	homo wt
28	F	1	homo var	hetero
29	F	1	homo var	hetero
30	M	1	hetero	hetero
31	F	1	homo var	hetero
32	F	3	homo var	hetero
33	F	1	homo var	hetero
34	M	3	hetero	hetero
35	F	1	hetero	homo wt
36	M	1	homo var	hetero
37	F	3	homo var	homo wt
38	F	3	homo var	homo wt
39	M	3	hetero	homo var
40	M	3	hetero	hetero
41	M	3	hetero	homo var
42	F	3	hetero	homo wt
43	M	3	homo var	hetero

44	M	3	homo var	homo var
45	F	3	homo var	hetero
46	M	3	x	x
47	F	3	hetero	hetero
48	M	3	homo var	hetero
49	M	1	hetero	homo wt
50	F	1	homo var	hetero
51	F	1	homo var	hetero
52	F	1	homo var	hetero
53	F	1	hetero	hetero
54	M	1	homo var	hetero
55	F	1	hetero	hetero
56	x	1	homo var	hetero
57	F	1	hetero	hetero
58	M	1	hetero	hetero
72	F	3	hetero	hetero
73	M	3	x	x
74	M	3	homo var	homo wt
75	F	3	homo wt	homo var
76	F	3	homo var	hetero
77	F	3	hetero	homo wt
78	M	3	hetero	hetero
79	M	3	hetero	hetero
80	M	3	homo var	homo wt
81	F	3	hetero	homo wt
82	F	3	hetero	homo wt
83	F	3	homo var	homo wt
84	M	3	hetero	homo wt
85	F	3	hetero	homo wt
86	M	3	x	x
87	M	3	x	x
88	F	3	x	homo wt
90	F	3	homo var	homo wt
91	M	3	homo var	hetero
92	F	3	x	hetero
93	M	3	homo wt	hetero
94	F	3	homo var	homo wt
95	F	3	homo wt	hetero
96	M	3	hetero	hetero
97	F	3	homo wt	hetero
98	M	3	homo var	homo wt
99	M	3	homo var	x
100	M	3	hetero	homo wt
101	F	3	hetero	hetero
102	F	3	homo wt	hetero
103	M	3	homo wt	homo wt