



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARCINOGENICOS E GENOTÓXICOS DO URÂNIO  
COMO INDICADOR DE RISCO À SAÚDE DE RESIDENTES DOS MUNICÍPIOS DE  
PRAINHA, MONTE ALEGRE E ALENQUER NO ESTADO DO PARÁ

**ADRIANA COSTA GUIMARÃES**

Belém - PA  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ADRIANA COSTA GUIMARÃES**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARCINOGENICOS E GENOTÓXICOS DO URÂNIO  
COMO INDICADOR DE RISCO À SAÚDE DE RESIDENTES DOS MUNICÍPIOS DE  
PRAINHA, MONTE ALEGRE E ALENQUER NO ESTADO DO PARÁ**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, concentração em Biologia Celular, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

Belém - PA  
2009

**ADRIANA COSTA GUIMARÃES**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARCINOGENICOS E GENOTÓXICOS DO URÂNIO  
COMO INDICADOR DE RISCO À SAÚDE DE RESIDENTES DOS MUNICÍPIOS DE  
PRAINHA, MONTE ALEGRE E ALENQUER NO ESTADO DO PARÁ**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, concentração em Biologia Celular, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**Data de aprovação: 18 de junho de 2009.**

Orientador:

**Prof.º Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano - Orientador**  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Avaliadores:

**Prof.º Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva**  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Prof.ª Dra. Marcia Consentino Kronka Sosthenes**  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Prof.º Dr.º Nilson Praia Anselmo**  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Prof.ª Dra. Patrícia Danielle Lima de Lima**  
Universidade do Estado do Pará – UEPA

Belém - PA  
2009

## **FONTES FINANCIADORAS E AVALIAÇÃO ÉTICA**

Este projeto tem orçamento aprovado para financiamento pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, segundo convênio firmado na proposta do Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT nº 024/2006 (Anexo 4).

O presente projeto tem consentimento aprovado no comitê de ética em pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical - NMT, da Universidade Federal do Pará (Anexo 3).

Dedico este trabalho aos residentes nos  
municípios localizados na área de estudo.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr. Rommel Burbano, inicialmente por ter me aceitado como estagiária voluntária no laboratório e, no decorrer destes nove anos, por sua orientação, dedicação, experiência científica e confiança durante minha formação.

A Banca Avaliadora, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Anderson Herculano, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Kronka, Prof<sup>o</sup> Dr. Nilson Anselmo e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Lima, por aceitarem o convite para compor a banca, e enriquecer este trabalho com suas críticas.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, que foram colaboradores na execução deste projeto. Aos colaboradores, Prof<sup>a</sup>. Lusânia Antunes da Universidade Estadual de São Paulo de Ribeirão Preto, aos amigos Alexandre e Schneider, Mestres pela UFPA de Santarém.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Humana que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta tese. Particularmente, ao Marcelo, grande amigo com quem aprendi muito nestes dois anos de doutorado e colaborador neste projeto; a Paty, amiga e parceira na elaboração e execução deste trabalho; ao André, sempre solícito em todas as atividades do laboratório e, especialmente, neste trabalho foi fundamental na troca de conhecimentos e experiências, além disso, tem grande participação em minha formação acadêmica, já que foi meu primeiro “orientador” direto (ele era estudante de mestrado) quando ingressei no laboratório e sempre contribuiu para a minha formação acadêmica.

Aos amigos de bancada, Aline, Thaís, Plínio; aos amigos do laboratório e da GDP: “menino” Plínio (de novo), “Da Bahia”, “Sidney”, “Pinga”, Taissa, Rodrigo, Helem, Luiz, Gabi, “Nando” Augusto, Tati, Leomá e “Jonh”, Carlos Rocha, Amanda, Priscila, Glorita, Dani, Tanielly e Joana, Camila, Lorena.

A Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular, pela qualidade do curso e pela organização. Aos funcionários do Instituto de Ciências Biológicas, assim como aos da Universidade Federal do Pará, que direta e indiretamente contribuíram para que esta Tese fosse executada.

Aos meus pais, Gilberto e Socorro Guimarães e minhas irmãs, que me apoiaram e incentivaram durante o doutorado. Ao Luiz André, por sua paciência, incentivo e amor dedicados a mim, especialmente nos momentos em que mais precisei.

A todos meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 Considerações gerais	13
1.2 Propriedades e efeitos tóxicos do Urânio	13
1.3 Exposição ao urânio: Estado da arte	15
1.4 Caracterização do problema	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
<b>3. METODOLOGIA</b>	21
3.1 Local da pesquisa	21
3.2 Delineamento experimental	21
3.3 Seleção de voluntários e aspectos éticos	22
3.4 Análise de aberrações cromossômicas	23
3.5 Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente para a translocação t(14;18)(q32;q21), aberrações estruturais para a banda 22q11.2 e amplificação do gene <i>MYC</i>	24
3.6 Teste do micronúcleo	24
3.7 Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente para MN	25
3.8 Ensaio do Cometa (versão alcalina)	26
3.9 Análise estatística	27
<b>4 RESULTADOS</b>	28
4.1 Análise de aberrações cromossômicas	28
4.2 Teste do micronúcleo	30
4.3 Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente	32
4.4 Ensaio cometa	37
<b>5 DISCUSSÃO</b>	39
<b>6 CONCLUSÃO</b>	46
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	47
<b>Anexo 1 QUESTIONÁRIO PARA SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS</b>	57
<b>Anexo 2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE</b>	61
<b>Anexo 3 PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO</b>	63

**SERES HUMANOS**

<b>Anexo 4</b>	<b>TERMO DE CONCESSÃO E ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO</b>	<b>64</b>
<b>Anexo 5</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA: <i>CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY</i></b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

- Figura 1** Mapa da região de estudo
- Figura 2** Metáfase humana controle submetida a técnica de FISH para marcação centromérica específica.
- Figura 3** Porcentagem de metáfases com alterações cromossômicas, em linfócitos do sangue periférico, dos indivíduos do grupo controle negativo e das populações
- Figura 4** Frequência de MN em 1000 linfócitos BN do sangue periférico de indivíduos dos grupos controle e expostos
- Figura 5** Metáfase e núcleo interfásico negativos para a t(14;18)
- Figura 6** Núcleos interfásicos apresentando dois sinais fluorescentes vermelhos (digoxigenina) para a sonda de sequência única
- Figura 7** FISH centromérico em linfócitos do sangue periférico
- Figura 8** Análise de índice de dano (ID) no DNA nas populações Monte Alegre, Prainha e Alenquer pelo ensaio cometa alcalino.
- Quadro 1** Padrão de escores de acordo com a cauda do cometa
- Tabela 1** Características demográficas das populações estudadas
- Tabela 2** IM, tipo e frequência de AC em linfócitos de indivíduos controle e expostos de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.
- Tabela 3** Frequência e distribuição de MN em linfócitos BN, e CBPI dos indivíduos dos grupos controle e expostos de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.
- Tabela 4** Número de sinais positivo e negativo por translocação cromossômica t(14;18) por núcleo no grupo controle nas populações expostas, determinados por FISH em linfócitos de sangue periférico.
- Tabela 5** Núcleos interfásicos apresentando dois sinais fluorescentes vermelhos (digoxigenina) para a sonda de sequência única em A) o gene MYC e em B) o locus 22q11.2.
- Tabela 6** Frequência de sinais MN determinada por FISH em 1000 linfócitos BN por amostra das três populações de estudo e do grupo controle pelo tabagismo.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AC</b>	Aberração Cromossômica
<b>BN</b>	Binucleado (a)
<b>CANP</b>	Colônia Agrícola Nacional do Pará
<b>CNEN</b>	Comissão Nacional de Energia Nuclear
<b>CRPM</b>	Companhia de Recursos Naturais
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DSB</b>	Quebras de fita dupla
<b>EU</b>	Urânio Empobrecido ou Depletado
<b>FISH</b>	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>ICRP</b>	Comissão Internacional de Proteção Radiológica
<b>ID</b>	Índice de Dano
<b>IGH</b>	Imunoglobulina
<b>IM</b>	Índice Mitótico
<b>INB</b>	Indústrias Nucleares do Brasil S.A.
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LCH</b>	Laboratório de Citogenética Humana
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MN</b>	Micronúcleo
<b>NMT</b>	Núcleo de Medicina Tropical
<b>Ra</b>	Radio
<b>Rn</b>	Radônio
<b>RPMI</b>	Instituto Memorial Royal Park (meio de cultura)
<b>SSB</b>	Quebras de fita simples
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TRICT</b>	Isotiocianato derivativo de tetrametilrodamina
<b>U</b>	Urânio
<b>UFPA</b>	Universidade Federal do Pará
<b>UI</b>	Unidades Internacionais

## RESUMO

No Estado do Pará, o município de Monte Alegre possui a maior área de mineralização de urânio do mundo, superior a 800 km<sup>2</sup>, que se estende aos municípios de Alenquer e Prainha. A 20 quilômetros de Monte Alegre, em uma colônia agrícola denominada de Inglês de Souza, existe uma maior concentração de urânio. Dessa área a população da cidade de Monte Alegre fez a retirada de alguns fragmentos de rocha para a construção de calçadas, pisos e residências. O urânio é um elemento metálico radiotivo natural, seu efeito no organismo é cumulativo e a exposição crônica a este elemento pode induzir a carcinogênese. A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) efetuou medidas de radiação gama nessa região obtendo valores inferiores aos recomendados pelo *International Commission on Radiological Protection*. Desta forma os valores medidos na cidade de Monte Alegre não representariam riscos à saúde da população. Por outro lado a Universidade Federal do Pará, que também desenvolveu uma pesquisa em Monte Alegre, afirmou o contrário, ou seja, a população corria risco de contaminação radioativa, e esta seria uma das causas do possível aumento de casos de câncer entre a população local. As duas investigações concordaram que seriam necessárias novas pesquisas para se chegar a uma conclusão definitiva sobre o assunto. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar a presença ou ausência de mutagenicidade e o risco de carcinogênese, induzido pela exposição natural ao urânio, nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer. No total foram analisados linfócitos de 143 voluntários, sendo utilizados como população controle 47 indivíduos de duas cidades de regiões diferentes do Brasil, Santarém (Estado do Pará) e Ribeirão Preto (Estado de São Paulo). A população de estudo foi composta por 96 voluntários (47 de Monte Alegre, 28 de Prainha e 21 de Alenquer). Foram utilizadas técnicas de citogenética clássica e molecular, bem como ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. Os resultados das análises revelaram que as frequências de formação de micronúcleos (centrômero positivo e/ou negativo), alterações cromossômicas (numéricas e estruturais), dano no DNA (verificado através do ensaio do cometa), mutações, translocações e amplificações em genes/regiões de susceptibilidade ao câncer (*BCL2*, *22q11.2* e *MYC*) e análise do índice mitótico, não foram estatisticamente diferentes entre a população controle e as três populações de estudo ( $P > 0.05$ ), portanto não foram detectadas citotoxicidade e genotoxicidade. Considerando que as populações situadas na região de estudo são provenientes de uma área rural, onde existe um grande consumo de verduras e frutas, uma hipótese seria que as substâncias que fazem parte da composição desses tipos de alimentos possam ter exercido um efeito protetor contra a radiação. Outra possibilidade é que a baixa radiação de urânio natural induza lesões no DNA, as quais seriam eficientemente reparadas pelas células expostas. Porém, a hipótese mais provável, é que o urânio presente na região geográfica onde a população de estudo está localizada, não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA, interferir na montagem das fibras do fuso e impedir a progressão do ciclo celular. O número de amostras analisadas e as técnicas utilizadas foram compatíveis às dos principais trabalhos deste gênero publicados na literatura especializada, o que atesta para o bom desempenho do presente projeto. A conclusão do presente projeto tem um grande impacto, por demonstrar que o urânio presente nesta região não é danoso à saúde humana.

**Palavras-chaves:** Biomonitoramento populacional, Urânio, Genotoxicidade, Carcinogênese.

## ABSTRACT

The municipality of Monte Alegre, located in the state of Pará, Brazil, possesses one of the largest uranium mineralization areas of the world, with an area larger than 800 km<sup>2</sup> that also includes the municipalities of Alenquer and Prainha. 20 km away from Monte Alegre, there are rocks named Black Shales that contain an elevated uranium concentration, and those rocks were used by the inhabitants for construction. Uranium is a metallic element, naturally radioactive, and its effect in the human organism is cumulative and the chronic exposure to this element might induce carcinogenesis. The Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) measured gamma rays in this region and they obtained values lower than the recommended by the *International Commission on Radiological Protection*, which would mean that the values obtained from Monte Alegre would not be a health threat for the habitants. However, a study performed by the Federal University of Pará found different results, claiming that this population would be under risk of radioactive contamination and that it would be the cause of a high incidence of neoplasias between the local population. However, both studies concluded that further investigations should be performed to get a final answer to this issue. The objective of the present study was to identify the presence or absence of mutagenicity and to assess the risk of carcinogenicity induced by the natural exposition to uranium in the population from Monte Alegre, Prainha and Alenquer municipalities. Genotoxicity assessment was performed in 143 individuals and 47 control individuals from two different regions of Brazil, Santarém (Pará) and Ribeirão Preto (São Paulo). Our studied population consisted of 96 individuals (47 from Monte Alegre, 28 from Prainha and 21 from Alenquer). We used classic and molecular cytogenetic techniques, along with genotoxicity and cytotoxicity assays. Our results showed that micronuclei frequency (centromere negative or positive), chromosomal alterations (both numerical and structural), DNA damage (determined by comet assay), mutations, translocations and amplifications in genes/regions related with cancer susceptibility *BCL2*, *22q11.2* e *MYC* and the analysis of mitotic index were not statistically different between our control population and our studied subjects ( $P > 0.05$ ). Considering that those populations are from a rural area, where there is a large intake of fruits and vegetables, one hypothesis is that the substances of those aliments might have any protective action against radiation. Another possibility is that the low doses of radiation emit by natural uranium ore present in the black shales might induce DNA lesions, which would be efficiently repaired by the damaged cells. But the most likely hypothesis is that the uranium present in this region is not enough to induce breaks in the DNA molecule, interfere in or to interfere with the setting up of the spindle fibers and stop cell cycle progression. Our sample size and the techniques used in this study were compatible with similar studies. This project has a great impact in that region, since it proves that the uranium present in that region is not harmful to human health.

**Key words:** Populational biomonitoring, Uranium, Genotoxicity, Carcinogenesis

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações gerais

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

Os danos no DNA induzidos por diversos agentes mutagênicos químicos e físicos podem ser reparados ou processados, mas muitos deles podem levar à formação de aberrações cromossômicas (ACs). As ACs induzidas podem ser estáveis ou não, sendo as primeiras relacionadas a pequenos danos, translocações recíprocas e algumas aneuploidias, que não impedem a divisão e proliferação celular, enquanto as não-estáveis, como os cromossomos dicêntricos e em anel, grandes deleções e fragmentos, normalmente são letais à célula. Diferentes alterações podem se acumular nas sucessivas divisões celulares e produzir mutações em genes, os quais teriam um papel fundamental no processo de carcinogênese (Little, 2000).

Os agentes químicos e físicos capazes de induzir a formação de AC são chamados de agentes clastogênicos, podendo ter seu potencial detectado por vários testes de mutagenicidade tais como a análise de ACs em células metafásicas, o teste do MN, o teste do cometa, entre outros (Al- Sabati *et al.*, 1992, Guimarães *et al.*, 2003, Movajagh *et al.*, 2005, Castañeda *et al.*, 2006).

A clastogenicidade pode resultar da interação direta desses agentes com o DNA ou de mecanismos indiretos que interferem com a replicação e o reparo da molécula. As quebras produzidas no DNA por agentes mutagênicos podem envolver uma única fita, as quais são denominadas de quebras de fita simples (*single strand breaks- SSB*), ou ambas as fitas, sendo denominadas de quebras de fita dupla (*double strand breaks - DSB*). Acredita-se que as DSBs sejam as principais lesões que resultem diretamente nos diversos tipos de AC, os quais podem ser detectados na primeira divisão mitótica subsequente à exposição das células ao composto mutagênico (Swierenga *et al.*, 1991).

O acúmulo de alterações no material genético da célula depende de vários fatores endógenos como gênero, idade e constituição genética, assim como de exógenos como hábitos de consumo, alimentação, uso de medicamentos, e exposição a químicos. Deste modo,

além da identificação desses agentes que podem interferir na instabilidade celular, deve-se considerar o nível de exposição individual e a suscetibilidade de cada indivíduo, enfatizando-se a existência de uma inter-relação entre fatores ambientais desencadeantes e fatores genéticos predisponentes (Du Four *et al.*, 2005).

## 1.2 Propriedades e efeitos tóxicos do urânio

O urânio (U) tem massa atômica igual a 238 (92 prótons e 146 nêutrons), pertencente à família dos actinídeos, sendo um metal pesado radioativo branco-prateado, denso, dúctil e maleável, mal condutor de eletricidade e que à temperatura ambiente encontra-se no estado sólido. Ele ocorre naturalmente no meio ambiente (no solo, ar, água, plantas, alimentos, corpo humano etc.). A composição isotópica, em massa, do urânio natural é  $^{238}\text{U}$  99,27%;  $^{235}\text{U}$  0,72% e  $^{234}\text{U}$  0,005%, com meias-vidas físicas de  $4,47 \times 10^9$  anos,  $7,04 \times 10^8$  anos e  $2,44 \times 10^5$  anos, respectivamente (Chazel *et al.*, 2000; Gavrilesco *et al.*, 2009).

O decaimento do  $^{238}\text{U}$  tem como produto intermediário o radônio ( $^{222}\text{Rn}$ ). O  $^{222}\text{Rn}$  é um produto radioativo que resulta da desintegração alfa do  $^{226}\text{Ra}$ , produzindo a cada desintegração, um átomo do gás nobre radônio (Somlai, 2006). Na natureza ocorre três diferentes isótopos, o  $^{219}\text{Rn}$  ( $t_{1/2} = 3,96$  segundos), o  $^{220}\text{Rn}$  ( $t_{1/2} = 55,6$  segundos), também conhecido como torônio, e o  $^{222}\text{Rn}$  ( $t_{1/2} = 3,82$  dias) (Oliveira, 2006).

O urânio é utilizado em indústria bélica (bombas atômicas e espoleta para bombas de hidrogênio) e na construção de usinas nucleares, com o objetivo de geração de energia elétrica. (Ribera *et al.*, 1996, Durakoviae, 1999). O urânio empobrecido ou depletado (UE) é um subproduto da indústria nuclear utilizado na fabricação de armas (Bailey *et al.*, 2008; NRC, 2008). O Brasil, segundo dados oficiais (INB - Indústrias Nucleares do Brasil S.A.), ocupa a sexta posição no “ranking” mundial de reservas de urânio (por volta de 309.000t de  $\text{U}_2\text{O}_8$ ).

A maioria de estudos na literatura relacionam o efeito tóxico do urânio a sua condição de metal pesado, mais do que a sua atividade radioativa. Os efeitos primários sobre a saúde humana, causados pela intoxicação com urânio, são a insuficiência renal, atraso no crescimento ósseo e danos no DNA (Brugge *et al.*, 2005) Também são reportados efeitos colaterais, tais como: náusea, dor de cabeça, vômito, diarreia e queimaduras. O efeito do urânio no organismo é cumulativo (o metal é paulatinamente depositado, sobretudo nos

ossos). A carcinogênese do pulmão está associada à exposição aos produtos de decaimento do urânio, principalmente ao radônio (UNSCEAR, 2008).

A exposição humana ao UE se deu principalmente nas Guerras do Golfo e dos Balcãs, onde este elemento passou a ser utilizado para a fabricação de munição para armas. Alguns veteranos da Guerra do Golfo e dos Balcãs apresentaram fadiga crônica, dor de cabeça, depressão, perda de memória e outros defeitos cognitivos, distúrbios do sono, agitação, desordens respiratórias e gastrointestinais, dores musculares e nas articulações, doenças da pele e febre intermitente; suspeita-se que muitos destes sintomas sejam devidos à exposição a altos níveis de UE (GAO, 2000).

A habilidade do UE de transformar células osteoblásticas imortais humanas em células tumorigênicas foi relatada por Miller *et al.* (1998). Miller *et al.* (2003) também demonstraram, por análise através do teste do MN, que a exposição ao UE causa instabilidade genômica em células expostas. Adicionalmente, em um estudo *in vivo*, Hahn *et al.* (2002) demonstraram que ratos machos *Wistar* desenvolveram reações proliferativas locais e sarcomas, quando implantados com fragmentos de UE.

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

### 1.3 Exposição ao urânio: Estado da arte

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

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

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

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

A frequência de AC e MN em linfócitos de sangue periférico foi aplicada como biomarcador dos efeitos da radiação em estudos de biomonitoramento (Norppa *et al.*, 2006; Bonassi *et al.*, 2007). Populações expostas ao UE na Bosnia e Herzegovina mostraram aumento da frequência de MN (Ibrulj *et al.*, 2004; Krunic *et al.*, 2005) e AC (Ibrulj *et al.*, 2007) em relação a populações controle, sugerindo que UE poderia ser um fator de risco para a saúde humana. Quando utilizada a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) com sonda Pan-Centromérica, é possível distinguir entre o MN originado de quebras cromossômicas (C-MN) e o MN originado de má-segregação cromossômica (C+MN) devido ao funcionamento errôneo do fuso ou cinetócoro durante a mitose (Fenech *et al.*, 1997).

Outro ensaio utilizado em estudos radiobiológicos de bimonitorização humana é o Ensaio Cometa (*alkaline single cell gel electrophoresis*) (Olive, 1999; Tice e Strauss, 1995 Sardas *et al.*, 2009). Lesões no DNA medidas pelo ensaio do cometa refletem exposição recente a agentes clastogênicos (Mateuca *et al.*, 2005). Monleau *et al.* (2006) utilizando esse teste demonstraram que a inalação de UE produzia DSB em células do lavado bronco-alveolar de

ratos. Em repetidas exposições ao UE, essa alteração também foi encontrada nas células renais dos roedores.

Trabalhadores ocupacionalmente expostos ao urânio parecem estar em maior risco de mortalidade por neoplasias de pulmão, laringe, e tecido linfático e hematopoiético (Canu *et al.*, 2008; Finch, 2007). Agentes genotóxicos como pesticidas e a radiação ionizante podem induzir o desenvolvimento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). A translocação cromossômica t(14;18)(q32;q21) é um marcador genético associado com o risco de desenvolvimento de LLA (Chiu *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2008). Esta translocação pode ser encontrada no sangue periférico de indivíduos expostos a agentes genotóxicos (McHale *et al.*, 2008). A t(14;18) une o gene *BCL-2* localizado no cromossomo 18 com o gene para a cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) localizado no cromossomo 14, resultando na inibição da apoptose pela super-expressão do gene *BCL-2* (Korsmeyer, 1999; Meijerink, 1997).

Outro marcador que pode ser utilizado em estudos de biomonitoramento ambiental é o gene *MYC*. A amplificação desse gene foi descrita como um elemento chave de vários processos carcinogênicos em humanos (Calcagno *et al.*, 2008). Linhagens celulares derivadas de glândulas mamárias de camundongo irradiado revelaram amplificação do gene *MYC* (Au, 1993).

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

Para se ter uma referência confiável de possíveis danos à saúde das populações expostas, o presente projeto teve como finalidade identificar a presença ou ausência de genotoxicidade, citotoxicidade e risco de carcinogênese, por contaminação com urânio, nas populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

#### **1.4 Caracterização do problema**

No norte do Brasil, na Amazônia Brasileira, o município de Monte Alegre, localizado em 2° 00' 24,9" S; 54° 04' 13,5" W, segundo a Companhia de Recursos Naturais (CPRM), possui

a maior área de mineralização de urânio do mundo, superior a 800 km<sup>2</sup>, que se estende aos municípios de Alenquer e Prainha (Figura 1).

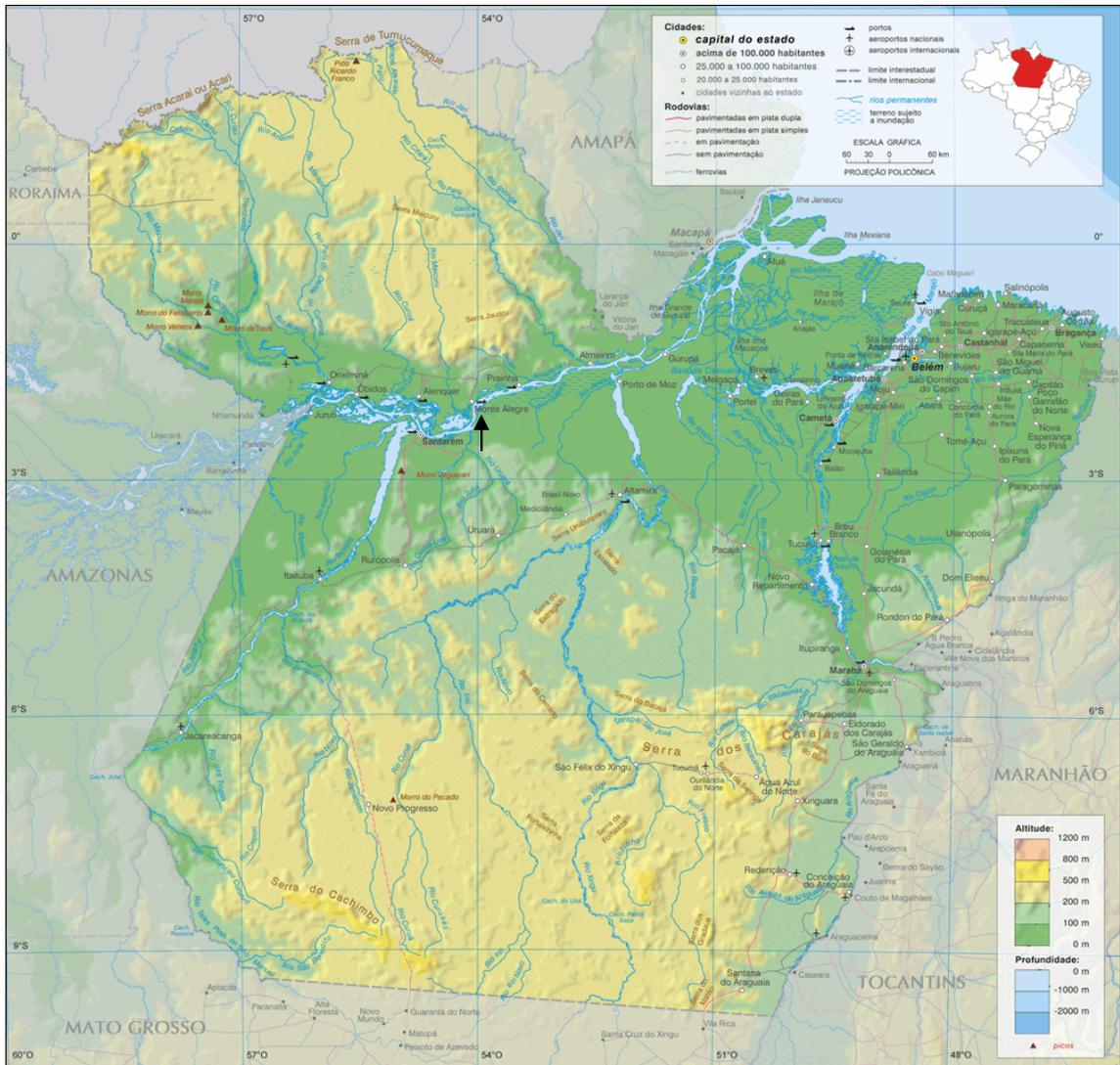


Figura 1 - Mapa da região de estudo: A seta aponta para a cidade de Monte Alegre, aos lados se encontram os municípios de Alenquer e Prainha (adaptado de <http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/mapas/index.html>).

A 20 quilômetros de Monte Alegre, na Colônia Agrícola Nacional do Pará (CANP) denominada de Inglês de Souza, existe uma maior concentração de urânio. Dessa área a população da cidade de Monte Alegre fez a retirada de alguns fragmentos de rocha para a construção de calçadas, pisos e residências. Entre as rochas da região, o urânio está presente em maior abundância nos *Black shales* (folhelhos negros), localizados a cerca de 20 metros de profundidade, porém com baixos teores (35 ppm de U<sup>3</sup>O<sup>8</sup>) (Pereira *et al.*, 1983). A utilização

de tais rochas para construção de casas constitui-se numa importante forma de exposição a radiações ionizantes, sobretudo ao gás radioativo  $^{222}\text{Rn}$ , que das *Black shales* é exalado. A concentração média de radônio nas residências construídas em Monte Alegre é de  $75 \pm 48 \text{ Bq.m}^{-3}$  e em Inglês de Souza é de  $116 \pm 84 \text{ Bq. m}^{-3}$  (Melo, 1999), enquanto que os limites recomendados pela Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP, Publicação 65) são de  $200 \text{ Bq. m}^{-3}$  (nível de ação) e  $600 \text{ Bq. m}^{-3}$  (nível de intervenção).

A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), entre 1995 e 1999, efetuou medidas de radiação gama obtendo valores da ordem daqueles observados, por exemplo, na cidade do Rio de Janeiro. Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, a CNEN julgou não ser necessário recomendar nenhuma ação remediadora.

Por outro lado, no ano 2000, o Instituto de Geociências da Universidade Federal do Pará (UFPA), que também desenvolveu uma pesquisa em Monte Alegre, afirmou o contrário, ou seja, a população corria risco de contaminação radioativa, e esta seria uma das causas do possível aumento de casos de câncer entre a população local.

Em pelo menos um ponto, no entanto, as duas investigações concordaram: são necessárias novas pesquisas para se chegar a uma conclusão definitiva sobre o assunto. Os ensaios cromossômicos são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação da atividade biológica, sendo utilizados e recomendados por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisa dos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa. Basicamente, esses ensaios avaliam o dano causado ao DNA pelo material em teste na presença ou ausência de sistemas metabólicos de ativação e têm por objetivo avaliar o risco potencial que os agentes tóxicos, como radiação, metais pesados e pesticidas, representam para a saúde humana (Brusick, 1991).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

O projeto teve como finalidade avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e carcinogênicos da exposição humana ao urânio na província mineral da bacia amazônica, Estado do Pará, entre os municípios de Prainha, Alenquer e Monte Alegre. O biomonitoramento citológico e genotoxicológico destas populações foi realizado, utilizando-se de biomarcadores sensíveis à contaminação, como a frequência de MN, AC, Índice Mitótico (IM) e danos ao DNA em cultura de linfócitos isolados dos habitantes desta região.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- a) Determinar a frequência de MN em linfócitos do sangue periférico pelo método convencional e por FISH, usando sondas centroméricas, para diferenciar MN induzidos por quebras cromossômicas daqueles provocados por erros na segregação;
- b) Analisar IM e as frequências de AC de linfócitos isolados da população em questão, através de técnicas citogenéticas convencionais e de FISH;
- c) Investigar a presença da translocação  $t(14;18)(q32;q21)$ , e de alterações estruturais no braço longo do cromossomo 22, na banda 22q11.2, por FISH, no sangue periférico da população objeto deste edital, com o intuito de investigar um possível risco para o desenvolvimento de leucemia ou sarcoma, respectivamente;
- d) Estabelecer a incidência de dano ao DNA nos linfócitos periféricos da população alvo pelo Ensaio do Cometa.
- e) Investigar o nível da amplificação do gene *MYC*.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Local da pesquisa**

A província mineral descoberta fica na borda da bacia amazônica, Estado do Pará, entre os municípios de Prainha, Alenquer e Monte Alegre, nas regiões conhecidas por Barreirinha e Ererê, esta última a apenas 40 km da cidade de Monte Alegre, no oeste do Estado.

A cidade de Monte Alegre é uma das mais antigas povoações da Amazônia. Possui uma população de cerca de 37.000 pessoas distribuídas por, aproximadamente, 5.600 domicílios. Desde 1977, levantamentos radiométricos e caracterizações geológicas realizadas pela CPRM revelaram ocorrência de urânio em uma área localizada a cerca de 20 km da cidade, onde foi instalado um assentamento agrícola na década de 50, denominado Inglês de Souza. A presença desta ocorrência uranífera foi investigada pela INB com o objetivo de avaliar a viabilidade econômica deste depósito. A partir de 1982, a população da cidade de Monte Alegre fez a retirada de alguns fragmentos de rocha da área de anomalia uranífera para a construção de calçadas, pisos e residências.

#### **3.2 Delineamento experimental**

Após a visita à província mineral, selecionamos um total de 164 voluntários, sendo 65 indivíduos oriundos de Monte Alegre, 51 de Prainha e 48 de Alenquer. Esses voluntários foram recrutados através de uma emissora de rádio local que informou à população os objetivos deste projeto.

Selecionamos um número maior de voluntários do que o proposto originalmente no projeto, visto que prevíamos enfrentar algumas dificuldades. Desta forma, dos 164 voluntários selecionados, realizamos as análises genotóxicas em 143 indivíduos. O motivo para a não participação de 21 indivíduos foi a contaminação acidental da cultura de linfócitos dos mesmos, fenômeno que aconteceu devido que na região de estudo não dispúnhamos das condições laboratoriais ideais.

O estudo comparou dois grupos distintos, um controle negativo e o outro objeto do estudo:

- Grupo 1, controle negativo, fizeram parte deste grupo 47 indivíduos não residentes na região de estudo, oriundos das cidades de Santarém-Pará e de Ribeirão Preto - São Paulo, distantes aproximadamente 100 e 2000 Km da área de estudo respectivamente. Essas

idades não têm registros de radioatividade natural e os voluntários selecionados não tem histórico de câncer familiar ou trabalharam em serviços de radiologia clínica. Os indivíduos deste grupo foram pareados por idade e gênero com os voluntários do grupo 2.

- Grupo 2, constituído por 143 indivíduos residentes na região de estudo, que moram em casas construídas com rochas extraídas da área analisada pela CNEN e pela UFPA.

### 3.3 Seleção de voluntários e aspectos éticos

Para o estudo com os linfócitos humanos, foi coletado sangue periférico dos doadores voluntários, obedecendo aos seguintes critérios:

- Critérios de Inclusão: Ter entre 20 e 50 anos e morar na região por mais de um ano.
- Critérios de Exclusão: Ser etilista, estar fazendo uso de algum medicamento, estar com alguma infecção (virótica ou bacteriana), ter sido submetido a raios-X, tomografia ou qualquer outro procedimento radiológico a menos de 3 meses e ter feito tratamento quimioterápico ou radioterápico em algum momento da vida.

Para o grupo controle (Grupo 2), a seleção dos voluntários foi realizada obedecendo os mesmos critérios utilizados para o a população de estudo (Grupo 1). Todos os sujeitos participantes foram esclarecidos acerca dos objetivos da pesquisa, responderam a um questionário, modificado do *Commission for Protection Against Environmental Mutagens Carcinogens Questionnaire* (Carrano e Natarajan, 1988) (Anexo 1), onde foram indagados sobre seus hábitos, idade, antecedentes ou qualquer outro fator que possa influir no resultado da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 2), declarando estar ciente de todos os propósitos do estudo.

A coleta do material foi realizada por profissionais capacitados do Laboratório de Citogenética Humana (LCH) da UFPA, nas dependências do local de habitação do voluntário selecionado ou nos Postos de Saúde de cada uma das três cidades estudadas. Na oportunidade, foram utilizados tubos *Vacutainer* heparinizados (5.000 UI/mL; *Liquemine® Roche*) e a quantidade de sangue coletada foi de 10 mL. A amostra obtida foi utilizada exclusivamente para execução desta pesquisa e os dados obtidos foram encaminhados para revistas especializadas, sendo mantido o sigilo e respeitada a privacidade dos voluntários. Estes podem a qualquer tempo solicitar informações sobre procedimentos e benefícios relacionados à pesquisa.

Por tratar-se de estudo em área temática especial, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA - Protocolo nº 002/2007 – CEP/NMT (Anexo 3). O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edinburgo (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS-MS). Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário esteve disponível aos pesquisadores e aos médicos, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo é inerente a sua função.

### **3.4 Análise de aberrações cromossômicas**

As AC são mudanças microscopicamente visíveis na estrutura do cromossomo que envolve uma quebra ou rearranjo do material cromossômico. Segundo Kucerova *et al.* (1982), teoricamente, as AC em linfócitos podem servir como um indicador de carcinogenicidade e de aumento de patogenia genética na progênie. Deste modo, o controle citogenético, através do teste de AC, assume um papel importante na análise qualitativa da mutagenicidade provocada por compostos radioativos, como o urânio, na população.

3.4.1 Obtenção e preparação do material: As preparações metafásicas para a análise convencional de AC foram obtidas seguindo os seguintes passos: 1) Transferir 5 mL de sangue periférico coletado em seringa descartável estéril heparinizada para um tubo falcon (15 mL) estéril e manter em estufa a 37 °C até sedimentar. 2) Preparar as culturas com 1 mL de plasma em 10 mL de meio de cultura consistindo de 80% RPMI e 20% de Soro Bovino Fetal, antibiótico (100 UI/mL de penicilina e 100 microg/mL de estreptomicina) e estimulados com 4% de fitohemaglutinina. 3) Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C por 72 horas, na ausência de drogas. 4) Posteriormente a colchicina (16 microg/mL, Sigma) foi adicionada, 2 horas antes de completar 72 horas de incubação. As lâminas foram preparadas usando uma técnica modificada de Moorhead *et al.* (1960) e as metáfases foram coradas com Giemsa para posterior visualização.

3.4.2 Análise das lâminas: As lâminas foram analisadas em teste cego. Em metáfases bem espalhadas e sem sobreposição, foram analisadas 100 metáfases/cultura em microscópio de luz e em objetiva de imersão e o índice mitótico (IM), determinado pela contagem do número

de metáfases em 2000 núcleos/cultura. O IM foi calculado usando-se a seguinte fórmula:  $IM = (\text{Número de metáfases} \times 100) \div 2000$ .

### **3.5 Hibridação In Situ Fluorescente para a translocação t(14;18)(q32;q21), aberrações estruturais para a banda 22q11.2 e amplificação do gene MYC**

As sondas de DNA utilizadas neste trabalho foram a LSI IGH/BCL2 dual color, para o rearranjo t(14;18) (Abbott-Vysis Inc., Downers Grove, IL). Para detectar uma possível amplificação do locus 22q11.2 e do gene *MYC* utilizamos as sondas comerciais SB2203-GRN e OC801-ORG, respectivamente (ChromoTrax™, Inc. USA). O preparo das lâminas e o processo de hibridação seguiram o protocolo de Chiu *et al.* (2006) com modificações. As lâminas foram contracoradas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) / 1,4-phenylene-diamine (antifade). A análise citogenética molecular foi realizada em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRICT. O sistema de captura e análise de imagens utilizado foi o da Applied Spectral Imaging (ASI). O estudo foi realizado em lâminas de boa qualidade e com hibridação *in situ* superior a 70% (Taylor *et al.*, 1994). Para cada amostra foram analisados 200 núcleos interfásicos.

### **3.6 Teste do micronúcleo**

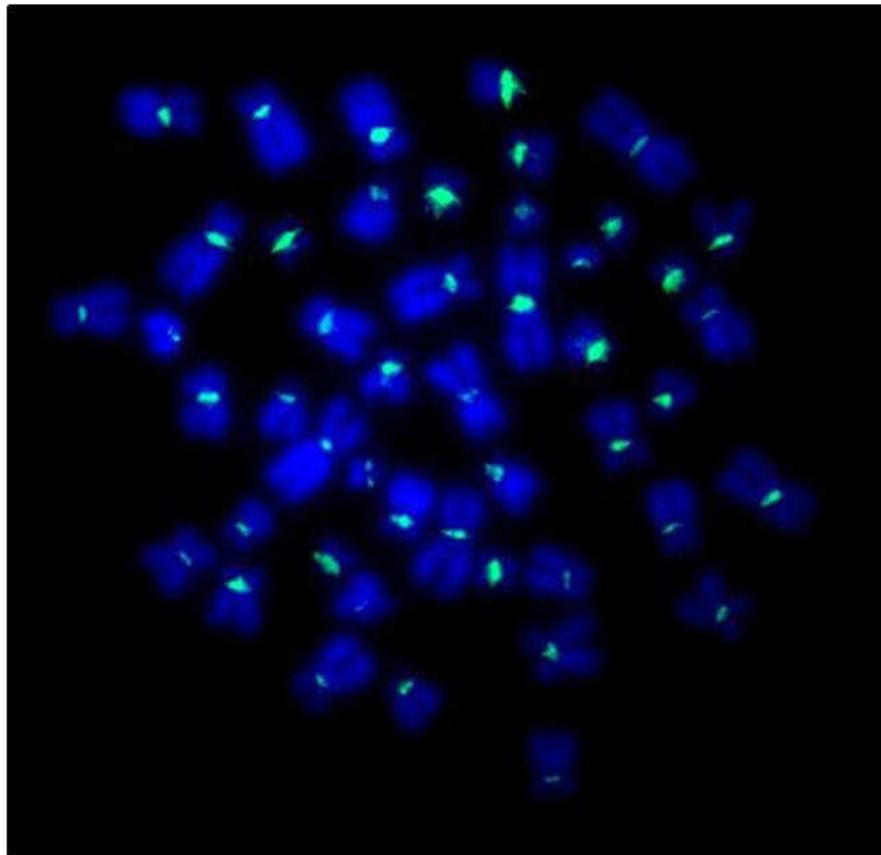
O teste de MN foi realizado usando a técnica da citocalasina B (Fenech e Morley, 1985). Os linfócitos foram cultivados como descrito acima. A citocalasina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em 3 microg/mL foi adicionada em 44 h de incubação. Após um total de 72 h a 37°C, as células foram colhidas após centrifugação, lavadas e submetidas a um rápido tratamento com solução hipotônica e, imediatamente, fixadas em fixador Carnoy (metanol:ácido acético).

As lâminas foram preparadas de acordo com o procedimento citogenético padrão e coradas com 4% de Giemsa. As lâminas foram codificadas e, em seguida, quantificadas por microscopia de luz em ampliação de 400x ou 1000x, quando necessário, por um único observador. Para cada experimento, 2000 linfócitos BN com citoplasma bem preservado foram conferidos. MN foram identificados de acordo com os critérios de Fenech *et al.* (2003). Como uma medida de citotoxicidade, o índice de proliferação por bloqueio-citocinese (CBPI - cytokinesis-block proliferating index) foi calculado segundo a seguinte fórmula:  $CBPI =$

$[MI+2MII+3(MIII+MIV)]/N$ , tal como proposto por Surrallés *et al.* (1995), onde MI-MIV representam o número de linfócitos humanos com 1-4 núcleos determinados em 500 células.

### 3.7 Híbridação *In Situ* Fluorescente para MN

O FISH centromérico foi realizado usando um conjunto de sondas de DNA alfa satélites centroméricas biotiniladas, específicas para todos os centrômeros humanos (ONCOR, P5095-B.5, Oncor Inc., USA). As sondas foram testadas sobre uma metáfase controle para marca o centromérica específica (Figura 2). O preparo das lâminas e o processo de hibrida o seguiram o protocolo de Bolognesi *et al.* (2004), com modifica es. A contracolora o foi com DAPI / antifade. A análise citogenética molecular foi realizada em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRICT. O sistema de captura e análise de imagem utilizado foi o da Applied Spectral Imaging. Os MN presentes em células BN com citoplasma intacto foram analisados para a presença de um ou mais pontos centrom ricos e foram classificados como centr mero-positivo (C+MN) ou centr mero-negativo (C-MN). Um total de 2000 linfócitos BN foi analisado para cada indivíduo.



**Figura 2** - Metáfase humana controle submetida a técnica de FISH para marca o centromérica específica. Os sinais em verde representam a marca o fluorescente no centr mero dos cromossomos corados em azul (DAPI).

### 3.8 Ensaio do Cometa (versão alcalina).

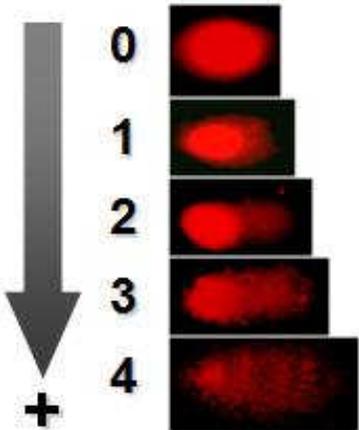
O teste segue a metodologia descrita por Singh *et al.* (1988). As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão. Aproximadamente 20.000 células em 10 microL de plasma foram misturadas com 120 microL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% para formar a suspensão de células. Em seguida, a suspensão de células foi aplicada sobre a primeira camada de agarose, sendo a lâmina, então, coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura por 5min até solidificar a agarose. Depois, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA , 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 1% N-Lauroyl sarcosine; pH 10) a 4°C e protegida da luz.

3.8.1 Eletroforese: Ao serem removidas da solução de lise, foram mergulhadas em solução de neutralização (0,4M tris; pH 7,5) e colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese. Esta estava em um “banho de gelo”, para manter a temperatura da eletroforese constante em torno dos 4°C. A cuba foi, então, preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH>13), a um nível superior (0,25 cm, em média) às lâminas. Estas ficaram em repouso por 20min para permitir o desempacotamento do DNA e a exposição dos sítios alcali-lábeis. A eletroforese foi conduzida usando 25V e 300 mA por 20 min. Todos esses passos foram realizados na presença de baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5min.

3.8.2 Coloração: As lâminas foram fixadas com etanol a 100%. Posteriormente, foram coradas com 50 microL de solução de Brometo de Etídio (20 microg/mL) e, em seguida, cobertas com lamínula para serem analisadas.

3.8.3 Análise das lâminas: As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência. A análise foi realizada pelo padrão de escores, onde, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, os mesmos serão divididos em cinco categorias (0-4) de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, que indicam o grau de lesão sofrido pela célula (Quadro 1).

**Quadro 1.** Padrão de escores de acordo com a cauda do cometa.

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0 = sem danos (&lt;5%)</li> <li>▪ 1 = baixo nível de danos (5-20%)</li> <li>▪ 2 = médio nível de danos (20-40%)</li> <li>▪ 3 = alto nível de danos (40-95%)</li> <li>▪ 4 = dano total (95%)</li> </ul>	
---	--

### 3.9 Análise estatística

Variáveis foram submetidas ao teste t “Student”. Para AC e ensaio do MN convencional, os dados de distribuição normal foram analisados por ANOVA. O nível de significância utilizado foi de 1% ( $P < 0,05$ ). Gaps foram quantificados, porém não incluídos no número total de AC e percentagem de metáfases aberrantes.

Para o ensaio cometa, os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, e para o FISH todas as avaliações estatísticas foram feitas usando o teste qui-quadrado. Os valores de P foram fixados em 5% ( $P < 0,05$ ).

#### 4. RESULTADOS

Os resultados descritos a seguir foram publicados na forma de artigo científico completo no periódico *Cell Biology and Toxicology* (DOI 10.1007/s10565-010-9152-8) (Anexo 3). As características demográficas dos indivíduos neste estudo estão listadas na Tabela 1. Não houve diferenças significativas entre os grupos controle e expostos (Monte Alegre, Prainha e Alenquer) com relação a idade, gênero e indivíduos fumantes e não fumantes ( $P>0,05$ ).

**Tabela 1:** Características demográficas das populações estudadas.

	Controle	Monte Alegre	Prainha	Alenquer	Total
<b>N</b>	47	47	28	21	143
<b>Idade (anos)</b>					
Média $\pm$ D,P,	33,15 $\pm$ 9,15	33,2 $\pm$ 10,3	35,64 $\pm$ 11,07	35,90 $\pm$ 10,58	34,47 $\pm$ 10,27
Faixa etária	19-60	20-60	19-56	21-52	19-60
<b>Gênero</b>					
Feminino (%)	9 (19,15)	11 (23,4)	8 (28,57)	5 (23,81)	33 (23,07)
Masculino (%)	38 (80,85)	36 (76,6)	20 (71,43)	16 (76,19)	110 (76,93)
<b>Fumo</b>					
Não fumante (%)	41 (87,23)	39 (82,98)	21 (75,00)	17 (80,05)	118 (82,51)
Fumante (%)	6 (12,77)	8 (17,02)	7 (25,00)	4 (19,05)	25 (17,49)

N = número amostral

##### 4.1 Análise de aberrações cromossômicas

O IM e o tipo e a frequência das AC encontradas nos linfócitos do sangue periférico dos indivíduos dos grupos de estudo e controle estão resumidos na Tabela 2. Não foram encontradas variações estatisticamente significativas, entre o IM das populações de estudo e o grupo controle ( $P>0,05$ ).

As alterações mais frequentes, em ambos os grupos, foram as quebras cromossômicas e cromatídicas. Rearranjos como cromossomos dicêntricos, em anel e figuras trirradiais foram eventos raros. As frequências de AC estruturais e numéricas (poliploidia e endoreduplicação) observadas nos indivíduos do grupo controle não foram estatisticamente diferentes das frequências observadas nas populações de estudo ( $P>0,05$ ).

**Tabela 2:** IM, tipo e frequência de AC em linfócitos de indivíduos dos grupos controle, Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

Grupos	Tamnho Amostral	IM (%)	Aberrações Cromossômicas					Polipl	End	Metáfases Aberrantes (%) <sup>a</sup>
			Ctg	Ctq	Chq	Rear	Total <sup>a</sup> (%)			
Total	143	4,48	0,75	0,88	0,29	0,15	1,32	13	14	1,03±0,48
Controle	47	4,60	0,64	0,95	0,23	0,17	1,36	3	2	1,12±0,40
Não Fumante	38	4,61	0,61	0,95	0,22	0,17	1,34	1	1	1,03±0,27
Fumante	9	4,44	0,83	1,00	0,33	0,16	1,50	2	1	1,33±0,93
Monte Alegre	47	4,80	0,70	1,04	0,25	0,13	1,43	4	3	1,06±0,57
Não Fumante	39	4,82	0,66	1,07	0,23	0,10	1,11	3	2	0,92±0,56
Fumante	8	4,66	0,85	0,85	0,37	0,25	1,55	1	1	1,09±0,54
Prainha	28	4,06	0,82	0,61	0,32	0,14	1,11	2	5	0,93±0,54
Não Fumante	21	4,09	0,81	0,52	0,24	0,14	0,95	1	2	0,90±0,67
Fumante	7	3,99	0,86	0,86	0,57	0,14	1,57	1	3	1,14±0,38
Alenquer	21	4,01	1,00	0,71	0,48	0,14	1,33	4	4	0,90±0,30
Não Fumante	17	4,13	1,00	0,71	0,47	0,12	1,29	3	2	1,00±0,00
Fumante	4	3,82	1,00	0,75	0,50	0,25	1,50	1	2	0,88±0,33

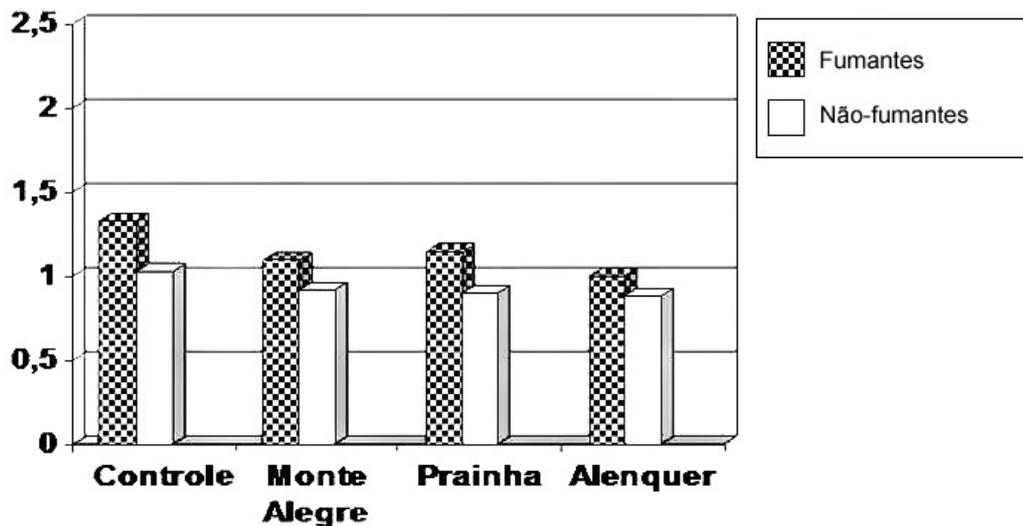
AC: 100 células analisadas por indivíduo; IM: 1000células analisadas por indivíduo.

Ctg: gaps cromatídicos; Ctq: quebras cromatídicas; Chq: quebras cromossômicas; Rear: rearranjos; D.P: desvio padrão.

<sup>a</sup>Ctg não incluído. Polipl: células poliplóides; End: endoreduplicação

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (P >0.05).

A frequência de AC encontrada em fumantes não apresentou um valor significativamente diferente da encontrada nos não fumantes na população controle. Esta observação também se repetiu na população de estudo e ao compararmos este hábito entre os dois grupos (Figura 3). A percentagem de metáfases aberrantes também foi semelhante estatisticamente em todas as categorias ( $P>0.05$ ) (Tabela 2).



**Figura 3** - Porcentagem de metáfases com alterações cromossômicas, em linfócitos do sangue periférico, dos indivíduos do grupo controle negativo e das populações de Monte Alegre, Prainha, e Alenquer, distribuídos nas categorias fumantes e não fumantes. Para cada indivíduo foram analisadas 100 metáfases.

#### 4.2 Teste do micronúcleo

As frequências de MN, em linfócitos de sangue periférico, dos indivíduos de Monte Alegre, Prainha, e Alenquer não foram estatisticamente diferentes quando comparadas com a frequência do grupo controle (1,92; 1,07; 1,48, e 2,09 MN/1000 CB, respectivamente). As frequências de MN dos voluntários de Monte Alegre e Prainha foram menores do que as frequências dos grupos controle e de Alenquer ( $P<0.05$ ). A população de Alenquer apresentou a maior frequência de MN, porém não foi estatisticamente significativa quando comparada á frequência do grupo controle ( $P>0.05$ ). A maioria dos linfócitos apresentou somente um MN por célula BN. Adicionalmente, o índice CBPI foi ligeiramente maior nos indivíduos de Alenquer, mas não foi estatisticamente significativo ( $P>0,05$ ). Não houve diferença na média de CBPI entre os grupos. A frequência de MN em linfócitos binucleados e o CBPI de grupos controle e expostos estão resumidos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Frequência e distribuição de MN, em linfócitos BN, e CBPI dos indivíduos dos grupos controle e expostos de Monte Alegre, Prainha e Alenquer.

Grupos	N	Total BN	MN/1000 células BN Média ± D.P.	Distribuição de MN			Total MN	CBPI Média ± D.P.
				1	2	3		
Total	143	283,237	1,64 ± 0,46	435	13	0	461	1,68 ± 0,20
Controle	47	94,000	1,92 ± 1,49	170	6	0	182	1,68 ± 0,39
Não fumante	6	12,000	2,33 ± 0,81	24	2	0	28	1,61 ± 0,30
Fumante	41	82,000	1,86 ± 1,40	146	4	0	154	1,73 ± 0,18
Monte Alegre	47	91,237	1,07 ± 0,98*	96	2	0	100	1,53 ± 0,35
Não fumante	8	16,000	1,13 ± 0,88	15	0	0	15	1,65 ± 0,34
Fumante	39	75,237	1,06 ± 1,15	81	2	0	85	1,51 ± 0,27
Prainha	28	56,000	1,48 ± 1,15*	87	3	0	93	1,54 ± 0,19
Não fumante	7	14,000	2,25 ± 1,48	45	2	0	49	1,60 ± 0,09
Fumante	21	42,000	0,86 ± 1,34	42	1	0	44	1,52 ± 0,22
Alenquer	21	42,000	2,09 ± 1,47**	82	2	0	86	1,96 ± 0,15
Não fumante	17	34,000	1,75 ± 1,40	70	1	0	72	2,15 ± 0,29
Fumante	4	8,000	2,18 ± 1,61	12	1	0	14	1,94 ± 0,10

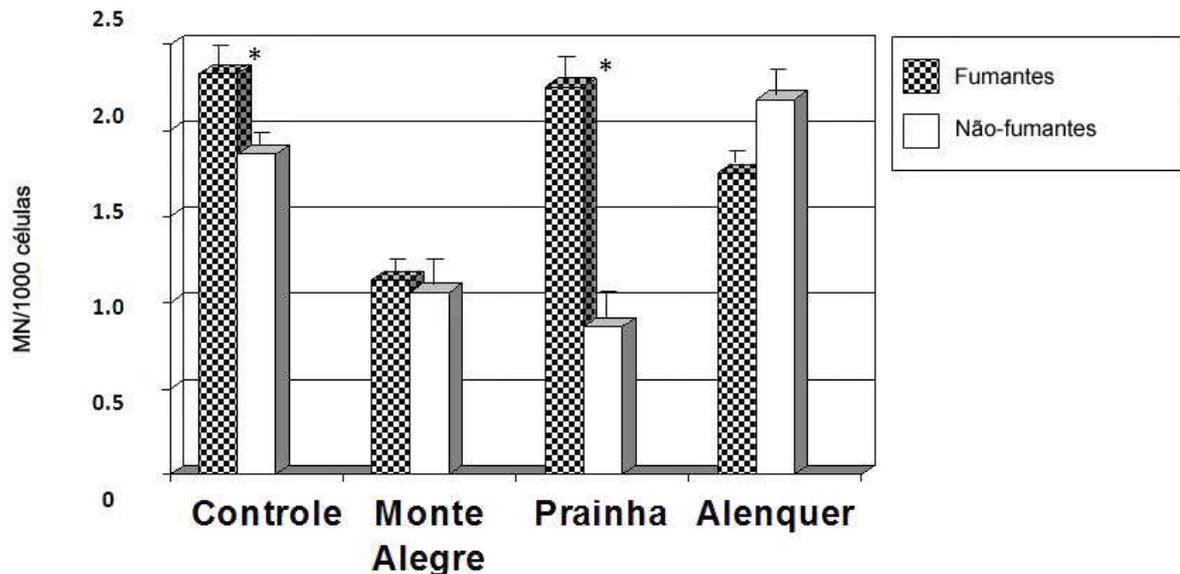
Para maioria dos casos, 2000 linfócitos BN foram analisados/indivíduo. CBPI = 500 células/indivíduo.

N = Tamanho amostral

\* Diferença estatisticamente significativa comparada com o controle (P <0.05).

\*\* Diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo de Monte Alegre (P <0.05).

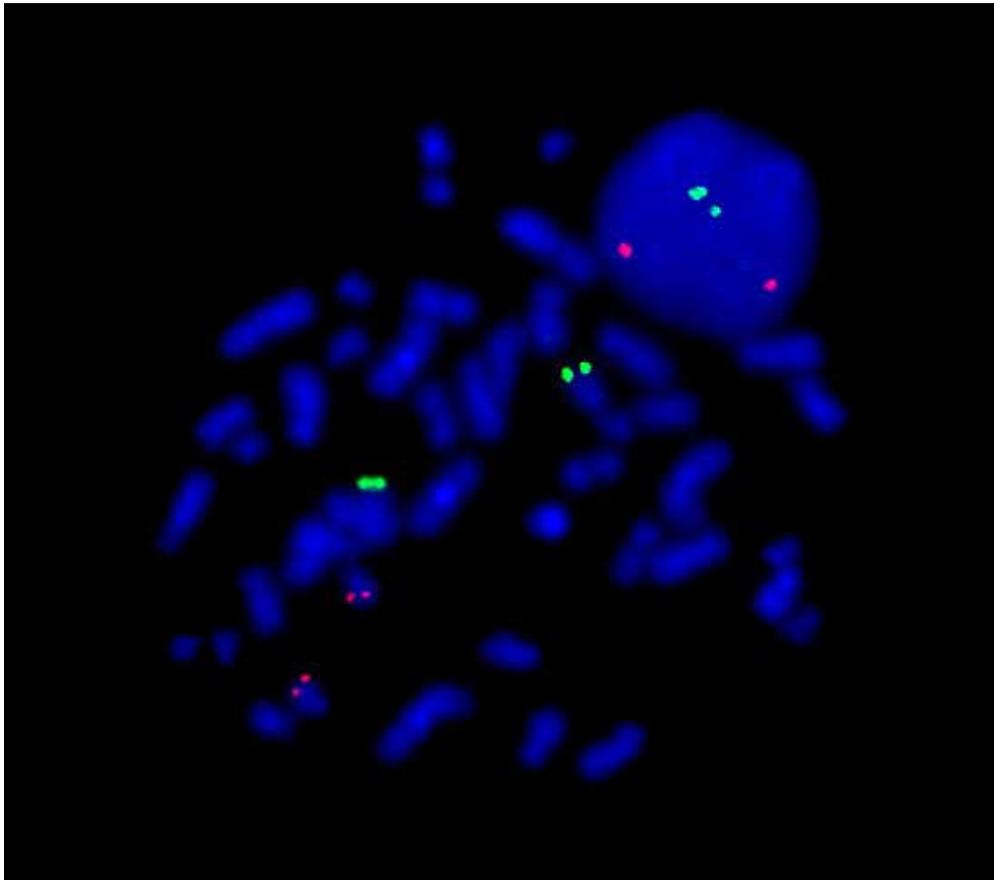
Em relação ao tabagismo, a frequência de MN foi significativamente maior nos indivíduos fumantes em relação aos não fumantes somente no grupo controle e na população de Prainha ( $P < 0.05$ ). Nos voluntários de Monte Alegre e Alenquer não encontramos essa diferença (Figura 4).



**Figura 4** - Frequência de MN em 1000 linfócitos BN do sangue periférico de indivíduos dos grupos controle e expostos de Monte Alegre, Prainha, e Alenquer, distribuídos em fumantes e não fumantes. \*Diferença estatisticamente significante entre indivíduos fumantes e não fumantes ( $p < 0.05$ ).

### 4.3 Hibridação *In Situ* Fluorescente

A maioria absoluta das células não apresentou a translocação *IGH/BCL2* (Figura 5). A presença desta alteração foi detectada em 1,9% das células da população controle. A população de Alenquer apresentou o valor mais alto (2,33%), porém este valor pode ser considerado falso positivo, visto que está abaixo do limite de *Cutoff* (teor de corte) de 7% estipulado para FISH com sonda de sequência única (Jiang *et al.*, 2002) (Tabela 4). Estatisticamente não houve diferença entre as populações de estudo e controle ( $P > 0,05$ ).



**Figura 5** - Metáfase e núcleo interfásico negativos para a t(14;18). Os sinais fluorescentes verdes mapeiam o gene *IgH* e os vermelhos o gene *BCL2*.

**Tabela 4:** Número de sinais positivos e negativos por núcleo para a translocação cromossômica t(14;18), no grupo controle e nas populações expostas, determinados por FISH em linfócitos de sangue periférico.

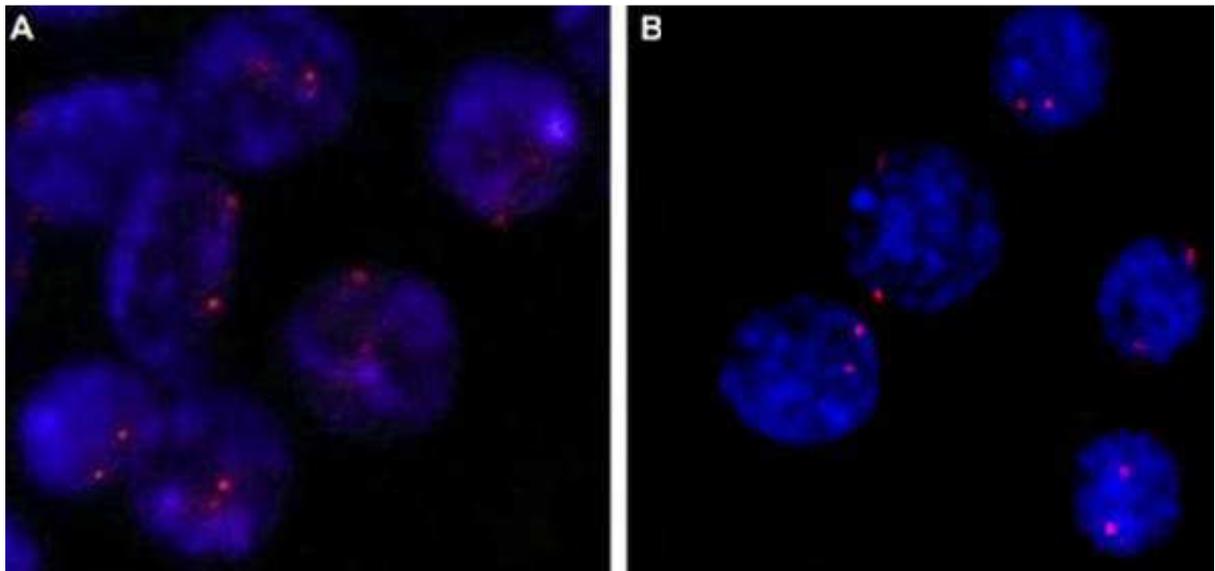
Grupos	N	% t(14;18)-positivo	% t(14;18)-negativo	D.P.
Controle	15	1,9 (n = 58)	98,1 (n = 2942)	1,30
Monte Alegre	15	2,2 (n = 62)	97,8 (n = 2938)	1,64
Prainha	15	2,5 (n = 67)	97,5 (n = 2933)	1,88
Alenquer	15	1,8 (n = 70)	97,2 (n = 2930)	2,02

Células analisadas por indivíduo (núcleo interfásico e metáfase) = 200.

N = Tamanho amostral

D.P. = Desvio Padrão

Na análise do número de sinais do gene *MYC* e da região cromossômica 22q11.2, a população controle apresentou 98 % das células com 2 sinais para estes dois marcadores (Figura 6A e 6B). A população de Prainha foi a que apresentou menor valor de células com dois alelos para o gene *MYC* (97,5%) e a população de Alenquer foi a que apresentou menor percentagem de células com 2 sinais para a região cromossômica 22q11.2 (97,10%). Estes valores não são diferentes estatisticamente dos controles e se encontram abaixo do limite de *Cutoff* de 7% estipulado para FISH de sequência única (Costa Raiol *et al.*, 2008). Estatisticamente não houve diferença entre as populações de estudo e controle ( $P>0,05$ ). A Tabela 5 resume a quantificação de sinais por núcleo desses dois marcadores de carcinogênese.



**Figura 6** - Núcleos interfásicos apresentando dois sinais fluorescentes vermelhos (digoxigenina) para a sonda de sequência única em A) o gene *MYC* e em B) o locus 22q11.2.

**Tabela 5:** Número de sinais de *MYC* e 22q11.2 por núcleo no grupo controle e nas populações expostas.

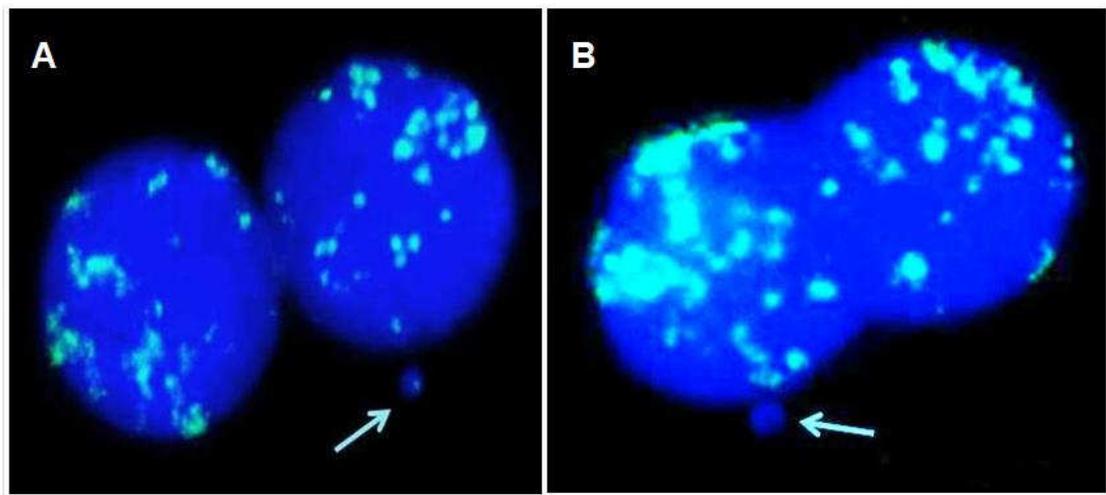
Grupos	N	% 22q11.2 (mean $\pm$ SD)*			% <i>MYC</i> (mean $\pm$ SD)*		
		1	2	$\geq 3$	1	2	$\geq 3$
Controle	15	2.00 $\pm$ 1.36 (n = 60)	97.70 $\pm$ 1.63 (n = 2931)	0.30 $\pm$ 0.82 (n = 9)	1.63 $\pm$ 1.03 (n = 49)	98.10 $\pm$ 0.86 (n = 2943)	0.27 $\pm$ 0.51 (n = 8)
Monte Alegre	15	1.83 $\pm$ 1.75 (n = 55)	97.77 $\pm$ 1.45 (n = 2933)	0.40 $\pm$ 0.94 (n = 12)	1.67 $\pm$ 1.04 (n = 50)	98.03 $\pm$ 1.03 (n = 2941)	0.30 $\pm$ 0.50 (n = 9)
Prainha	15	1.70 $\pm$ 1.45 (n = 51)	97.84 $\pm$ 1.63 (n = 2935)	0.46 $\pm$ 0.80 (n = 14)	2.07 $\pm$ 1.18 (n = 62)	97.5 $\pm$ 1.30 (n = 2925)	0.43 $\pm$ 0.64 (n = 13)
Alenquer	15	1.87 $\pm$ 1.87 (n = 56)	97.10 $\pm$ 2.35 (n = 2912)	1.03 $\pm$ 1.73 (n = 32)	2.00 $\pm$ 1.51 (n = 60)	97.60 $\pm$ 1.57 (n = 2928)	0.40 $\pm$ 0.41 (n = 12)
Total	60	1.85 $\pm$ 1.60 (n = 222)	97.65 $\pm$ 1.81 (n = 11717)	0.50 $\pm$ 1.27 (n = 61)	1.84 $\pm$ 1.24 (n = 221)	97.81 $\pm$ 1.30 (n = 11737)	0.35 $\pm$ 0.53 (n = 42)

\*Células analisadas por indivíduo (núcleo interfásico e metáfase): 200.

\*\*Desvio padrão (DP)

N: Número amostral

Através da técnica de FISH também analisamos a presença de possíveis efeitos clastogênicos e aneugênicos nos linfócitos do sangue periférico dos indivíduos expostos, pela constituição dos MN C+ e C- (Figura 7, A e B). O efeito aneugênico, representado pelos C+MN, foi ligeiramente mais pronunciado do que o efeito clastogênico, representado pelos C-MN. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $P>0.05$ ).



**Figura 7** - FISH centromérico em linfócitos do sangue periférico. As setas apontam para MN presentes em células. A) MN apresentando um ponto centromérico (C+MN) e B) MN centrômero-negativo (C-MN).

A frequência de MN, nos indivíduos dos grupos exposto e controle, está dentro da faixa esperada, sendo parte da frequência basal de MN, definida em 6,5 MN/1000 BN, para linfócitos do sangue periférico humano (Bonassi *et al*, 2001).

Os indivíduos não-fumantes dos grupos expostos e controle apresentaram uma frequência maior de C+ do que os não fumantes. Entretanto, esta diferença também não foi estatisticamente significativa ( $P>0.05$ ). As frequências dos diferentes tipos de C+MN e C-MN dos indivíduos expostos e controles estão resumidas na Tabela 6.

**Tabela 6:** Freqüência de sinais MN determinada por FISH em 1000 linfócitos BN por amostra das três populações de estudo e do grupo controle pelo tabagismo.

Grupos	N	Número de MN/1000 BN (média ± D,P,)			
		Total MN	C+MN	C-MN	C+MN(%)/C-MN(%)
Expostos	15	1,85 ± 1,13	0,96 ± 0,60	0,89 ± 0,68	51,92 / 48,08
Não fumante	5	2,00 ± 0,40	1,13 ± 0,25	0,87 ± 0,25	56,25 / 43,75
Fumante	10	1,80 ± 1,27	0,90 ± 0,70	0,90 ± 0,80	50,00 / 50,00
Controle	10	1,60 ± 0,32	0,95 ± 0,16	0,65 ± 0,24	59,38 / 40,62
Não fumante	5	1,80 ± 0,27	1,00 ± 0,00	0,80 ± 0,27	55,56 / 44,44
Fumante	5	1,40 ± 0,22	0,90 ± 0,22	0,50 ± 0,00	64,29 / 35,71

N: Tamanho amostral

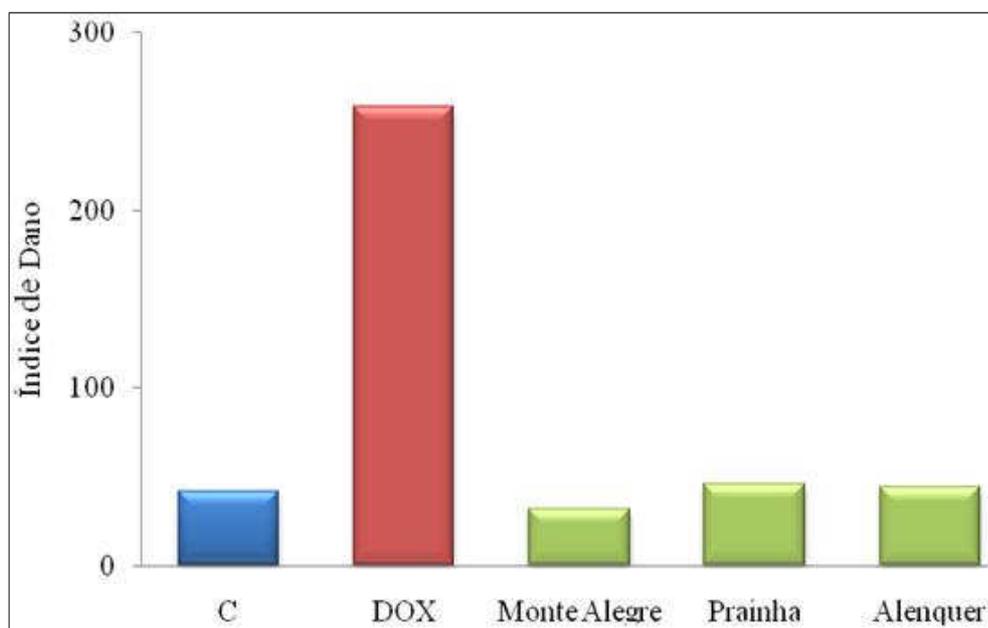
C-MN: MN contendo sinais de fragmentos de cromossomos acêntricos;

C+MN: MN contendo um ou mais sinais de cromossomos inteiros.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P>0.05$ ).

#### 4.4 Ensaio cometa

Esta técnica não revelou diferença estatística entre os índices de dano ao DNA das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer e do grupo controle negativo ( $P>0.05$ ). Nenhuma das três populações estudadas teve valores de danos no DNA equivalentes aos linfócitos tratados com doxorrubicina por 3h ( $0.5 \mu\text{M}$ ), que foi utilizado neste experimento como controle positivo (Figura 8).



**Figura 8** - Análise de índice de dano (ID) no DNA nas populações Monte Alegre, Prainha e Alenquer pelo ensaio cometa alcalino. Voluntários não expostos foram selecionados como controle negativo (C) e o controle positivo (DOX) foram linfócitos de indivíduos saudáveis expostos a doxorubicina por 3 h. As barras representam a média  $\pm$  D.P.

## 5. DISCUSSÃO

A utilização de material de origem natural como: terra, pedra, cimento, calcário, fertilizantes, entre outros, para serem utilizados nos mais variados fins da atividade humana, pode constituir uma importante fonte adicional de exposição crônica às radiações ionizantes. Desde 1977, levantamentos radiométricos e caracterizações geológicas realizadas na região de estudo (Figura 1), precisamente a 20 km do município de Monte Alegre, revelaram ocorrências de urânio nas rochas, decorrente de afloramentos minerais ocorridos no passado (Pereira *et al.*, 1983; Melo, 1999).

O nível de radiação por urânio, encontrado na região de estudo, é considerado baixo [35 ppm de  $U^3O^8$ ] quando comparado com os níveis detectados em outras partes do mundo, como na Área de Tushki e Kalabsha no Egito, onde a concentração de urânio varia entre 591 e 2.051 ppm, ou do sudeste da Ásia e na Turquia que também apresentam altas concentrações desse metal (106 ppm e 1.353 ppm respectivamente) (El-Dine *et al.*, 2004).

Melo (1999), após análise de amostras da rocha e de solo da região de estudo, observou que embora as concentrações de  $^{238}U$  e  $^{226}Ra$  do local apresentaram valores superiores em 17 vezes aos encontrados em áreas urbanas afastadas, onde as casas não foram construídas com pedras retiradas da área de urânio, a taxa de dose gama no solo, medida a 20 cm do solo, é na média apenas 1,7 vezes superior, demonstrando a necessidade de correlacionar essas medidas antagônicas com um possível efeito genotóxico das populações humanas da região.

A exposição humana ao urânio natural acontece principalmente na mineração e no processamento desse metal (Kathren, 1998; UNSCEAR, 2008). A exposição doméstica ao urânio, o qual pode coexistir com seus produtos de decaimento (rádio, tório, radônio), também é uma via alternativa de contaminação radioativa e provoca o aumento de AC em concentrações elevadas. A análise citogenética, de linfócitos do sangue periférico, de ocupantes de casas cujo interior apresentavam concentrações superiores a  $200 \text{ Bq.m}^{-3}$  de  $^{222}Rn$ , apresentou uma frequência significativamente superior de cromossomos em anel e dicêntricos e de translocações, em relação aos indivíduos controle (não expostos), (Bauchinger *et al.*, 1994; Oestreicher *et al.*, 2004).

A exposição crônica ao urânio pode levar ao seu acúmulo nos tecidos ósseo e renal (Mirto *et al.*, 1999; Leggett e Pellmar, 2003). Fontes de água natural, utilizadas pelo homem para

consumo, são factíveis de contaminação pelo urânio (Thiébault *et al.*, 2007). Ingestão de água contaminada por urânio foi observada na Finlândia (Kurtio *et al.*, 2006), porém os indicadores de citotoxicidade foram negativos e a avaliação dos rins da população exposta não revelou a presença de disfunção renal. Da mesma forma, neste trabalho, nenhum dos voluntários entrevistados atestou a ocorrência de doença renal (dados não apresentados).

Os efeitos citogenéticos da exposição crônica a níveis baixo de radiação, ainda não estão totalmente esclarecidos (Chang *et al.*, 1999, Miller *et al.*, 2005). De acordo com Milacic *et al.* (2004), a exposição a níveis baixos de radiação não tem influência direta sobre a saúde humana, embora 5-10% dos indivíduos da população são radio sensíveis e qualquer dose de radiação natural pode produzir efeitos biológicos nesses indivíduos.

O UE, que é um subproduto do processo de enriquecimento do isótopo do urânio, apresenta atividade específica radioativa baixa (Hindin *et al.*, 2005) e pode ser utilizado como parâmetro de comparação. McDiarmid *et al.* (2004) e Dorsey *et al.*, (2009), revelaram que veteranos de guerra feridos com munição fabricada com UE e que retiveram fragmentos de projeteis no seu organismo, apresentam altos níveis de urânio na urina. As análises indicaram, além da alteração de parâmetros fisiológicos dos túbulos renais proximais, alterações genotóxicas que associam mutações no locus *HTRT* (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*) com concentrações elevadas de urânio na urina.

A citotoxicidade do UE em estudos *in vitro*, em diferentes linhagens e tipos celulares varia entre doses de 200 a 800  $\mu\text{M}$ . (Carrière *et al.*, 2004; Mirto *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 2006). Células da linhagem NRK-52<sup>E</sup> sofrem morte celular por apoptose após a exposição a baixas doses de UE. Para altas concentrações de UE, as células sofreram necrose (Thiébault *et al.*, 2007). O IM das populações de Monte Alegre, Prainha e Alenquer não apresentou diferenças significativas em relação à população controle ( $P > 0.05$ ). É possível que nos indivíduos analisados, a exposição crônica a baixos níveis de radiação, não interferiu com a progressão do ciclo celular.

A exposição de diferentes tipos celulares ao UE *in vitro* aumenta a frequência de MN (Miller *et al.*, 2001a,b Miller *et al.* 2003) e a taxa de transformação fenotípica das células (Miller *et al.*, 1998). Yazzie *et al.* (2003) relataram que a inalação de UE por ratos pode produzir quebras e danos oxidativos nas bases nitrogenadas do DNA. A interação direta do UE com o DNA foi relatada por Stearns *et al.* (2005) e Lin *et al.* (1993), em células EM9 de ovário de hamster

Chinês (CHO), ao demonstrarem que o UE pode formar adutos de DNA, MN, troca entre cromátides irmãs e AC. Células de osteoblastos humanos também apresentaram estas alterações, após a exposição ao UE (Miller *et al.*, 2002, 2003).

A frequência de AC e MN observada nos indivíduos do grupo controle não foi estatisticamente diferente da frequência observada na população de Monte Alegre, Prainha e Alenquer ( $P > 0,05$ ). Provavelmente a emissão do urânio presente na região geográfica onde a população de estudo esta localizada, não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA ou para interferir na montagem das fibras do fuso ou que a radiação emitida é suscetível de reparo pela célula.

Também não encontramos diferenças significativas nas frequências de MN e AC entre gêneros ( $P > 0,05$ ). Esta observação está de acordo com o trabalho de Gourabi e Mozdarini (1998), os quais observaram que a distribuição e a frequência de MN em linfócitos de trabalhadores expostos a radiação e controles não é diferente quando homens e mulheres são comparados. Joseph *et al.* (2004) também não observaram diferenças significativas nas frequências de MN entre gêneros de trabalhadores expostos à radiação.

O hábito de fumar é obviamente um fator adicional que pode provocar mudanças no genoma celular. Existe um sinergismo entre a fumaça emitida pelo tabaco e a exposição à radiação emitida pelo radônio (Balmes e Scannell, 1997; Baias *et al.*, 2009), aumentando de 10 a 20 vezes, em comparação com os não fumantes, o risco de desenvolver câncer de pulmão (IAEA, 1986).

Fumantes que consomem grande número de cigarros por dia ( $> 20$ ) e se expõe a baixos níveis de radiação, apresentam uma frequência maior de formação de MN, que indivíduos expostos não fumantes ou que consomem pouca quantidade de cigarros por dia (Fenech, 1993; Dias *et al.*, 2007).

No presente trabalho, as frequências de AC encontrada em fumantes e não fumantes da população de Monte Alegre e Alenquer não apresentaram um valor significativamente diferente. Esse resultado pode ser explicado pelo pequeno número de fumantes na amostra, ou porque o consumo diário de cigarros por dia, dos indivíduos analisados era menor que vinte.

Bonassi *et al.* (2003), num estudo sobre o hábito de fumar e a frequência de MN nos linfócitos humanos, ao analisarem 5.710 indivíduos com algum tipo de exposição ocupacional,

chegaram à conclusão que os danos genotóxicos aparecem de forma significativa a partir do consumo de mais de 30 cigarros por dia, este elevado consumo de cigarros explicaria a diferença entre fumantes e não fumantes das populações controle e de Prainha, onde a maioria de indivíduos fumava em torno de 30 cigarros ao dia ( $P < 0.05$ ) (Figura 4).

Mészáros *et al.* (2004) estudaram um grupo de 141 indivíduos, que trabalharam em minas de urânio e tiveram diferentes tempos de exposição ao radônio, no encerramento das atividades de mineração e 20 anos após. As análises cromossômicas revelaram que as aberrações encontradas logo após o fechamento da mina persistiram nas células dos indivíduos durante um longo período de tempo. Sendo assim o radônio produziria efeitos clastogênicos a longo prazo. Na população estudada neste trabalho não esperamos encontrar alterações cromossômicas a longo prazo, visto que atualmente as alterações encontradas não apresentam diferença em relação ao controle.

A técnica de FISH foi utilizada para explicar a origem dos MN presentes nos linfócitos das populações analisadas. A questão investigada foi se os MN foram induzidos devido ao efeito clastogênico ou aneugênico do urânio. Como a constituição do MN é influenciada pelo tipo de exposição, como também por fatores biológicos (idade e gênero), a caracterização do seu conteúdo é de suma importância no biomonitoramento de populações humanas expostas a genotóxicos (Kapka *et al.*, 2007).

Com base na pesquisa realizada em trabalhadores de minas de urânio, foi sugerido que a baixa percentagem de C+MN pode ser um marcador de instabilidade genômica e predisposição ao câncer (Kryscio *et al.*, 2001). Os nossos resultados revelaram a presença de C+MN e C-MN nas populações de estudo e controle (Tabela 6). Não houve diferença entre a proporção de C+MN/C-MN entre as populações de estudo e controle e entre os subgrupos fumantes e não fumantes.

Com relação a população controle, os nossos resultados são semelhantes aos resultados do grupo controle de Thierens *et al.* (2000) e Attia (2007) que analisaram a composição cromossômica de MN em medula óssea de rato e linfócitos humanos, respectivamente, nesses estudos os indivíduos controles também não apresentaram diferenças entre a quantidade de C+MN e C-MN. Por outro lado, estudos como o de Kryscio *et al.* (2001) e Kapka *et al.* (2007),

relataram que em indivíduos de populações controle os níveis de C-MN eram significativamente menores que os de C+MN.

Diferentes resultados foram encontrados ao analisar o efeito da radiação ionizante sobre a composição do MN. Thierens *et al.* (2000) estudaram linfócitos de trabalhadores ocupacionalmente expostos, em ambiente hospitalar, a raio X e radiação gama, usando a técnica de FISH do MN e encontraram um aumento dos C+MN nos indivíduos expostos em relação aos controles. Por outro lado Vral *et al.* (1997) num ensaio *in vitro* revelaram que a radiação gama induz o aumento de C-MN em relação aos C+MN, apontando para uma ação clastogênica da radiação. Adicionalmente o aumento dos dois tipos de MN, C+MN e C-MN, foi encontrado por Chang *et al.* (1999) em indivíduos submetidos à radiação ionizante, em relação à população controle. Neste projeto não observamos aumento do número de C+MN e/ou de C-MN nas populações de estudo, em relação aos indivíduos controles.

Como observado, pouco se conhece sobre o efeito da radiação em baixas doses sobre populações humanas. Os resultados são contraditórios, portanto são necessários mais estudos para definir, se o efeito sobre os MN é específico de acordo com o tipo de radiação ionizante.

Como o nível de radiação de urânio é considerado baixo na região de estudo (35 ppm de  $U^3O^8$ ), é provável que somente a alta emissão de radiação provoque lesões no DNA. De acordo com isto, somente altas concentrações de EU provocariam alterações no genoma, como relatado por Monleau *et al.* (2006), que descreveram um efeito genotóxico desse metal em células bronco alveolares de ratos, através do ensaio cometa, apenas em concentrações altas. Usando esse mesmo ensaio, Thiébault *et al.* (2007), detectaram DSB e SSB e/ou sítios lábeis no DNA, após a exposição de células NRK – 52<sup>E</sup> a concentrações sub-letais e letais de UE. As lesões no DNA aumentaram de forma diretamente proporcional com a concentração de urânio.

Na população de estudo o índice de dano encontrado na molécula do DNA, revelado pelo ensaio do cometa, não foi diferente da população controle. Porém ao comparar estas populações com o controle positivo, linfócitos de indivíduos tratados por 3h com doxorrubicina (0.5  $\mu$ M), todas diferiram estatisticamente ( $P < 0.05$ ). Neste estudo não foram incluídos os voluntários fumantes, visto que a sensibilidade do ensaio cometa é alta e o hábito de fumar é considerado um *Confounding Factor* (Moller *et al.*, 2000).

A partir dos dados de Monleau *et al.* (2006), Thiébault *et al.* (2007), e os do presente estudo podemos inferir que existe a possibilidade que o UE em baixas concentrações ou a baixa radiação de urânio natural induza pequenas lesões no DNA, as quais podem ser eficientemente reparadas pelas células expostas. Estes resultados são consistentes com a observação de que após a exposição a baixas concentrações de UE, células renais humanas em cultura permanecem no seu status fisiológico normal, porém após contaminação com altas concentrações desse metal, as culturas apresentam morte celular (Prat *et al.*, 2005).

Miller *et al.* (1998; 2005) desenvolveram um modelo de leucemogêneses *in vivo*, em camundongos que receberam células hematopoiéticas murinas (FDC-P1) com uma concentração alta de sedimento do UE. Nesses trabalhos foi constatado que animais que receberam implantes celulares com baixas concentrações de EU, não apresentaram um incremento no desenvolvimento de leucemias. Provavelmente a carcinogênese encontrada na região de estudo está relacionada a indivíduos que apresentam suscetibilidade genética à radiação ou predisposição familiar ao desenvolvimento do câncer, embora a taxa de mortalidade por câncer em Monte Alegre não seja maior que o padrão da região norte do Brasil (Estado do Pará), onde as populações de estudo estão localizadas (SBPC, 2003)

No presente trabalho os indivíduos que apresentaram maior quantidade de AC, independentemente que estas não ultrapassaram o 5% das células analisadas, nas populações de estudo foram comparados com os indivíduos controles para três marcadores gênicos de carcinogênese. Urnovitz *et al.* (1999) sugeriram que ampliações do DNA da região 22q11.2, possivelmente induzida pela exposição ao urânio durante a Guerra do Golfo, podem estar relacionadas à patogênese da Síndrome da Guerra do Golfo. A análise por FISH, nas populações objeto deste projeto, não revelou aumento no número de cópias desta região cromossômica.

Estudos *in vivo*, conduzidos em ratos e camundongos, demonstraram que o UE altera a expressão de genes envolvidos no processo apoptótico (Taulan *et al.*, 2004; Monleau *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2006). Em células renais humanas, após exposição ao EU, a expressão de genes relacionados com a apoptose também foi modificada (Prat *et al.*, 2005). O gene *MYC* é um importante regulador da apoptose (Meyer *et al.*, 2006) e a sua amplificação é suficiente para levar à transformação celular *in vitro* e *in vivo* (Chung e Levens, 2005). Porém nossas análises, por FISH, não revelaram aumento no número de alelos desse gene nos indivíduos estudados.

O terceiro marcador estudado neste trabalho foi translocação t(14;18)(q32;q21), que justapõe os genes *IGH* e *BCL-2*. Esta alteração quando presente em linfócitos caracteriza a LLA. Como citado anteriormente, este rearranjo resulta no aumento da expressão do oncogene *BCL-2*, que induz a leucemia por interferir no mecanismo de apoptose normal dos linfócitos B (Jiang *et al.*, 2002). A presença desta aberração não é suficiente para o desenvolvimento da LLA, desde que esta alteração pode ser encontrada em células não neoplásicas (Janz *et al.*, 2003; Brassesco, 2008), porém o aumento da sobrevivência das células B permite que danos no DNA sejam acumulados, favorecendo o desenvolvimento da LLA (Liu *et al.*, 1994; Bäsecke *et al.*, 2002).

Casos de LLA, acima do esperado para a população, foram encontrados na cidade de Fallon, Nevada, USA. Nesta região a análise da água dos poços detectou concentrações de radioatividade alfa de arsênio, radônio e de urânio (Seiler, 2004). Em outro estudo, foram identificados casos de LLA em indivíduos com menos de 20 anos de idade numa região da Suécia durante 1980-1989. Foi detectada a presença de urânio no concreto utilizado na construção de casas. Os resultados de estudos epidemiológicos sugeriram risco de LLA, entre as crianças e os jovens adultos, por radiação ionizante no interior das residências dessa região (Axelson *et al.*, 2002).

Não encontramos a presença da t(14;18)(q32;q21) acima dos 5% das células analisadas, nos indivíduos da população exposta ao urânio e controle, segundo Jiang *et al.* (2002) valores abaixo dos 7% podem ser considerados falsos positivos, embora Brassesco (2008) sugira que diferentes rearranjos associados a leucemia/linfoma, tais como *IGH/BCL2*, podem ser encontrados em uma porcentagem pequena de células de indivíduos saudáveis sem aparentes consequências oncogênicas.

A radiação emitida nas residências construídas com rochas uríferas em Monte Alegre apresentou uma média de 116 +/- 84 Bq. m<sup>-3</sup>, valor este que representa pouco mais da metade do valor máximo do recomendado pela ICRP (Publicação 65), que recomenda intervenção radiológica para valores que variam entre 200 a 600 Bq.m<sup>-3</sup>. Desta forma os valores medidos na cidade de Monte Alegre não representariam riscos à saúde da população do ponto de vista da Proteção Radiológica. Os nossos resultados corroboram com os limites estabelecidos pela ICRP.

## **6. CONCLUSÃO**

As populações estudadas neste trabalho são provenientes de uma área rural, onde existe um grande consumo de verduras e frutas. Uma hipótese seria que as substâncias que fazem parte da composição desses tipos de alimentos possam ter exercido um efeito protetor contra a radiação. Porém o mais provável é que o urânio presente na região geográfica onde a população de estudo está localizada, não é suficiente para induzir quebras na molécula de DNA, interferir na montagem das fibras do fuso e impedir a progressão do ciclo celular. Outra possibilidade é que a baixa radiação de urânio natural induza pequenas lesões no DNA, as quais podem ser eficientemente reparadas pelas células expostas. A conclusão do presente projeto tem um grande impacto, visto que coloca fim ao estado de ansiedade das populações estudadas, principalmente a de Monte Alegre, com relação a se o urânio natural presente na região pode afetar a saúde dos habitantes ou não. A ausência de genotoxicidade encontrada nos indivíduos analisados, por diferentes técnicas, auxilia de forma definitiva a encerrar essa polêmica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABATI K, LLOYD D.C, EDWARDS AA, STEGNAR, P. A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. *Mutat Res.* 280:215-23, 1992.
- ATTIA S.M. Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with rifampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence in situ hybridization with pancentromeric DNA probe. *Toxicology.* 235:112-118, 2007.
- AU WW. Abnormal chromosome repair and risk of developing cancer. *Environ Health Perspect.* 10:303-308, 1993.
- AXELSON O, FREDRIKSON M, AKERBLUM G, HARDELL L. Leukemia in childhood and adolescence and exposure to ionizing radiation in homes built from uranium-containing alum shale concrete. *Epidemiology.* 13:146-150, 2002.
- BAILEY MR, BERAL V, CLAYTON B, DARBY SC, GOODHEAD DT, HENDRY JH, MARSH C, MURRAY V, SMITH B, SPRATT BG, STONEHAM M. The health hazards of depleted uranium munitions. 2001. <<http://royalsociety.org/displaypagedoc>> (Accessed 24.03.2010).
- BALMES JR, SCANNELL CH. Pulmonary effects of firefighting. *Occup Med.* 10:789-801, 1995.
- BÄSECKE J, GRIESINGER F, TRÜMPER L, BRITTINGER G. Leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *Ann Hematol.* 81:64-75, 2002.
- BAUCHINGER M, SCHMID E, BRASELMANN H, KULKA U. Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from occupants of houses with elevated indoor radon concentrations. *Mutat Res.* 310:135-42, 1994
- BOLOGNESI C, LANDINI E, PERRONE E, ROGGIERI P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutat Res.* 557:109-17, 2004.
- BONASSI S, FENECH M, LANDO C, LIN YP, CEPPI M, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, JIA C, DI GIORGIO M, FERGUSON LR, FUCIC A, LIMA OG, HRELIA P, KRISHNAJA AP, LEE TK, MIGLIORE L, MIKHALEVICH L, MIRKOVA E, MOLESSO P, MÜLLER WU, ODAGIRI Y, SCARFFI MR, SZABOVA E, VOROBTSOVA I, VRAL A, ZIJNO A. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 37:31-45, 2001
- BONASSI S, NERI M, LANDO C, CEPPI M, LIN YP, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, FENECH M. HUMN collaborative group. Effect of smoking habit

- on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat. Res.* 543:155-166, 2003.
- BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI MR, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 28:625-631, 2007.
- BRASSESCO M.S. Leukemia/lymphoma-associated gene fusions in normal individuals. *Genet Mol Res.* 7:782-790, 2008.
- BRUGGE D, DE LEMOS JL, OLDMIXON B. Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review. *Rev Environ Health.* 20:177-93, 2005.
- BRUSICK, D. A proposed method for assembly and interpretation of short-term test data. *Environ. Health Perspect.* 96:101-11, 1991.
- CALCAGNO DQ, LEAL MF, ASSUMPTIÃO PP, SMITH MA, BURBANO RR. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 14:5962-68, 2008.
- CAMARGO, IMC, MAZZILLI B. Estimativa de risco devido à ingestão de isótopos de urânio em fontes de águas minerais. *Rev Saúde Pública.* 32:317-20, 1998.
- CANU IG, ELLIS ED, TIRMARCHE M. Cancer risk in nuclear workers occupationally exposed to uranium - emphasis on internal exposure. *Health Phys.* 94:10-7, 2008.
- CARRANO AV, NATARAJAN AT. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. ICPENC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res.* 204:379-406, 1988.
- CARRIÈRE M, AVOSCAN L, COLLINS R, CARROT F, KHODJA H, ANSOBORLO E, GOUGET B. Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 17:446-52, 2004.
- CASTAÑEDA AN, TÉLLEZ MGO, RODRIGUEZ-ANNAIZ R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerase I (camptotecin) na II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of *Drosophila melanogaster*. *Mut Res.* 604:83-90, 2006.
- CHANG WP, HSICH WA, CHEN DP, LIN YP, HWANG JS, HWANG JJ, TSAI MH, HWANG BJ. Change in centromeric and acentromeric micronucleus frequencies in human populations after chronic radiation exposure. *Mutagenesis.* 14:427-432, 1999.
- CHAZEL V, HOUPERT P, ANSOBORLO E, HENGE-NAPOLI MH, PAQUET F. Variation of solubility, biokinetics and dose coefficient of industrial uranium oxides according to specific surface area. *Radiat Prot Dosimetry.* 88:223-31, 2000.

- CHIU BC, DAVE BJ, BLAIR A, GAPSTUR SM, ZAHM SH, WEISENBURGER DD. Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 108:1363-9, 2006.
- CHIU BC, LAN Q, DAVE BJ, BLAIR A, ZAHM SH, WEISENBURGER DD. The utility of t(14;18) in understanding risk factors for non-Hodgkin lymphoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 39:69-73, 2008.
- CHUNG HJ, LEVENS D. C-MYC expression: keep the noise down! *Mol Cells*. 20:157-66, 2005.
- COSTA RAIOL LC, FIGUEIRA SILVA EC, MENDES DA FONSECA D, LEAL MF, GUIMARÃES AC, CALCAGNO DQ, KHAYAT AS, ASSUMPÇÃO PP, SMITH MA, BURBANO RR. Interrelationship between MYC gene numerical aberrations and protein expression in individuals from northern Brazil with early gastric adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 181:31-5, 2008.
- DIAS FL, ANTUNES LMG, REZENDE PA, CARVALHO FES, SILVA CMD, MATHEUS JM, OLIVEIRA JVJ, LOPES GP, PEREIRA GA, BALARIN MAS. Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Environ Toxicol and Pharmacol*. 23:228-33, 2007.
- DU FOUR VA, JANSSEN CR, BRITS E, VAN LAREBEKE N. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. *Mutat Res*. 588:106-17, 2005.
- DURAKOVIAE A. Medical Effects of Internal Contamination with Uranium. *Croatian Medical Journal*. v. 40, n. 1, 1999.
- EL-DINE NW, SROOR A, EL-SHERSHABY A, EL-BAHI SM, AHMED F. Radioactivity in local and imported kaolin types used in Egypt. *Appl Radiat Isot*. 60:105-9, 2004
- FENECH M, CHANG WP, KIRSCH-VOLDERS M, HOLLAND N, BONASSI S, ZEIGER E. HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. 534:65-75, 2003
- FENECH M, HOLLAND N, CHANG WP, ZEIGER E, BONASSI S. The human micronucleus project - an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat Res*. 428:271-83, 1997.
- FENECH M, MORLEY AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*. 147:29-36, 1985
- FENECH M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect*. 3:101-7, 1993.
- FINCH SC. Radiation-induced leukemia: lessons from history. *Best Pract Res Clin Haematol*. 20:109-18, 2007.

- FINKEL MP. Relative biological effectiveness of radium and other alpha emitters in CF n. 1 female mice. *Proc Soc Exptl Biol Med.* 83:494-98, 1953.
- FINKEL, MP. Relative biological effectiveness of radium and other alpha emitters in CF n. 1 female mice. *Proc Soc Exptl Biol Med.* 83:494-8, 1953.
- GAO (United States General Accounting Office). Gulf War illness. Understanding of health effects from DU evolving but safety training needed GAO/NSIAD-00-70, 2000.
- GATTÁS GJF, SEGRE M WÜNSCH FILHO V. Genetics, molecular biology and ethics: work and health connections. *Ciência & Saúde Coletiva.* 7:159-67, 2002.
- GAVRILESCU M, PAVEL LV, CRETESCU I. Characterization and remediation of soils contaminated with uranium. *J Hazard Mater.* 163:475-510, 2009.
- GOURABI H, MOZDARANI H. A cytokinesis-blocked micronucleus study of the radioadaptive response of lymphocytes of individuals occupationally exposed to chronic doses of radiation. *Mutagenesis.* 13:475-80, 1998.
- GUIMARÃES APA, DIAS FL, CARDOSO RS, KRONKA SN, SAKAMOTO-HOJO ET. Chromosomal aberration induced by 5-azacytidine combined with VP-16 (etoposide) in CHO-K1 and XRS-5 cell lines. *Teratog Carcinog Mutagen.* 23:171-86, 2003.
- HAHN F. F., GUILMETTE R. A., HOOVER M. D. Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats. *Environ Health Perspect.* 110:51-59, 2002.
- HINDIN R, BRUGGE D, PANIKKAR B. Teratogenicity of depleted uranium aerosols: a review from an epidemiological perspective. *Environ Health.* 4:17, 2005.
- IBRULJ S, HAVERIĆ S, HAVERIĆ A. Chromosome aberrations as bioindicators of environmental genotoxicity. *Bosn J Basic Med Sci.* 7:311-6, 2007.
- IBRULJ S, KRUNIC-HAVERIC A, HAVERIC S, POJSKIC N, HADZISELIMOVIC R. Micronuclei occurrence in population exposed to depleted uranium and control human group in correlation with sex, age and smoking habit. *Med Arh.* 58:335-8, 2004.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, in: *Biological Dosimetry. Technical reports series N° 260.* IAEA, Vienna, Austria, 1986.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION – ICRP. Protection against radon-222 at home and at work, *Annals of the ICRP.* 65:23, 1993.
- JANZ S, POTTER M, RABKIN CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer.* 36:211-23, 2003.
- JIANG F, LIN F, PRICE R, GU J, MEDEIROS LJ, ZHANG HZ, XIE SS, CARAWAY NP, KATZ RL. Rapid detection of IgH/BCL2 rearrangement in follicular lymphoma by interphase

- fluorescence in situ hybridization with bacterial artificial chromosome probes. *J Mol Diagn.* 4:144-9, 2002.
- JOSEPH LJ, PATWARDHAN UM, SAMUEL AB. Frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res.* 564:83-8, 2004.
- KAPKA L, BAUMGARTNER A, SIWIŃSKA E, KNUDSEN LE, ANDERSON D, MIELZYŃSKA D. Environmental lead exposure increases micronuclei in children. *Mutagenesis.* 22:201-7, 2007.
- KATHREN RL. NORM sources and their origins. *Appl Radiat Isot.* 49:149-68, 1998.
- KORSMEYER S.J. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death, *Cancer Res.* 59:1693s-1700s, 1999.
- KRUNIĆ A, HAVERIĆ S, IBRULJ S. Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arh Hig Rada Toksikol.* 56:227-32, 2005.
- KRYSCIO A, ULRICH MÜLLER WU, WOJCIK A, KOTSCHY N, GROBELNY S, STREFFER C. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int J Radiat Biol.* 77:1087-93, 2001.
- KUCEROVA M, KOCANDRLE V, MATOUSEK V, POLIVKOVA Z. RENELTOVA I. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges (SCEs) in patients undergoing long-term Imuran therapy. *Mutat Res.* 94:501-9, 1982.
- KURTTIO P, HARMOINEN A, SAHA H, SALONEN L, KARPAS Z, KOMULAINEN H, AUVINEN A. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am J Kidney Dis.* 47:972-82, 2006.
- LEGGETT RW, PELLMAR TC. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact.* 64:205-25, 2003.
- LIN RH, WU LJ, LEE CH, LIN-Shiau SY. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 319:197-203, 1993.
- LITTLE JOHN, B. Ionizing Radiation. In: *Cancer Medicine*. Bast Jr, RC; Kufe DW; Pollock, R E, Weichselbaum, RR; Holland JF; Frei E. 5th edition. Ed. B.C. Decker Inc. 2400 pp, 2000.
- LIU Y, HERNANDEZ AM, SHIBATA D, CORTOPASSI GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8910-14, 1994.
- MACKNESS B, DURRINGTON PN, MACKNESS MI. Low paraoxonase in Persian Gulf War veterans self-reporting Gulf War syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 276:729-33, 2000.

- MATEUCA R, AKA PV, DE BOECK M, HAUSPIE R, KIRSCH-VOLDERS M, LISON D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol Lett.* 156:277-88, 2005
- MCDIARMID MA, ENGELHARDT S, OLIVER M, GUCER P, WILSON PD, KANE R, KABAT M, KAUP B, ANDERSON L, HOOVER D, BROWN L, HANDWERGER B, ALBERTINI RJ, JACOBSON-KRAM D, THORNE CD, SQUIBB KS. Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A.* 67:277-96, 2004.
- McHALE CM, LAN Q, CORSO C, LI G, ZHANG L, VERMEULEN R, CURRY JD, SHEN M, TURAKULOV R, HIGUCHI R, GERMER S, YIN S, ROTHMAN N, SMITH MT. Chromosome translocations in workers exposed to benzene. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 39:74-7, 2008.
- MEIJERINK JP. t(14;18), a journey to eternity. *Leukemia.* 11:2175-2187, 1997.
- MELO VP. Avaliação da concentração do <sup>222</sup>Rn nos ambientes internos e externos em residências do município de Monte Alegre, PA. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 120 pp, 1999.
- MÉSZÁROS G, BOGNÁR G, KÖTELES GJ. Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners. *J Occup Health.* 46:310-15, 2004.
- MEYER N, KIM SS, PENN LZ. The Oscar-Worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 16:275-87, 2006.
- MILACIC S, PETROVIC D, JOVICIC D, KOVACEVIC R, SIMIC J. Examination of the health status of populations from depleted-uranium-contaminated regions. *Environmental Research.* 95:2-10, 2004.
- MILLER A. C., BROOKS K., STEWART M., ANDERSON B., SHI L., MCCLAIN D., PAGE N. Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact.* 64:247-59, 2003.
- MILLER AC, BELTRAN D, RIVAS R, STEWART M, MERLOT RJ, LISON PB. Radiation- and depleted uranium-induced carcinogenesis studies: characterization of the carcinogenic process and development of medical countermeasures. *NATO RTG-099.* 2005.
- MILLER AC, BLAKELY WF, LIVENGOOD D, WHITTAKER T, XU J, EJNIK JW, HAMILTON MM, PARLETTE E, JOHN TS, GERSTENBERG HM, HSU H. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ. Health. Perspect.* 106:465-71, 1998.
- MILLER AC, STEWART M, BROOKS K, SHI L, PAGE N. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *J. Inorg Biochem.* 91:246-52, 2002.

- MILLER AC, XU J, MOG S, MCKINNEY L, PAGE N. Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles: Induction of genotoxic effects. *Carcinogenesis*. 22:115-26, 2001a.
- MILLER AC, XU J, STEWART M, MCCLAIN D. Suppression of depleted uranium-induced neoplastic transformation of human cells by the phenyl fatty acid, phenyl acetate: chemoprevention by targeting the p21RAS protein pathway. *Radiat Res*. 155, 163-70, 2001b.
- MIRTO H, BARROUILLET MP, HENGE-NAPOLI MH, ANSOBORLO E, FOURNIER M, CAMBAR J. Influence of uranium (VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells. *Hum Exp Toxicol*. 18:180-187, 1999.
- MØLLER P, KNUDSEN LE, LOFT S, WALLIN H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 9:1005-15, 2000.
- MONLEAU M, DE MÉO M, PAQUET F, CHAZEL V, DUMENIL G, DONNADIEU-CLARAZ M. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci*. 89:287-295, 2006.
- MOORHEAD PS, NOMELL PC, MELLMAN WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 20:613-116, 1960.
- MOORHEAD PS, NOMELL, PC, MELLMAN WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 20:613-16, 1960.
- MORGAN WF, DAY JP, KAPLAN ML, MCGHEE EM, LIMOLI CL. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res*. 146, 247-58, 1996.
- MOVAJAGH A., MALEKI F., MOHAMMADZADEH S.G., FADARI S.. Association of glutathione S-transferase and chromosomal aberrations as a means to determine occupational exposure. *Int Congress Series*. 1276, 197-98, 2005.
- NATARAJAN A.T. Techniques for biomonitoring of human populations for genetic effects. *Rev Brasil Genet*. 16:841-47, 1993.
- NORPPA H, BONASSI S, HANSTEEN IL, HAGMAR L, STRÖMBERG U, RÖSSNER P, BOFFETTA P, LINDHOLM C, GUNDY S, LAZUTKA J, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIÁNOVÁ E, SRÁM RJ, KNUDSEN LE, BARALE R, FUCIC A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*. 600:37-45, 2006.
- NRC (National Research Council). Review of the Toxicologic and Radiologic Risks to Military Personnel from Exposures to Depleted Uranium During and After Combat. Washington, DC: The National Academies Press, 2008.
- OESTREICHER U, BRASELMANN H, STEPHAN G. Cytogenetic analyses

- OLIVE PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology, *Int J Radiat Biol.* 75:395-405, 1999.
- OLIVEIRA, DS. Um estudo sobre o desequilíbrio radioativo da série do urânio em amostras de solo. Dissertação – Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo, 2006.
- PELLMAR TC, FUCIARELLI AF, EJNIK JW, HAMILTON M, HOGAN J, STROCKO S, EMOND C, MOTTAZ HM, LANDAUER MR. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci.* 49:29–39, 1999.
- PEREIRA ER, ZENQUER AO, CHAMON N. – Projeto Monte Alegre - Avaliação de indícios – Empresas Nucleares Brasileiras, 1983.
- PRAT O, BERENQUER F, MALARD V, TAVAN E, SAGE N, STEINMETZ G, QUEMENEUR E. Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics.* 5:297-306, 2005.
- RIBERA D, LABROT F, TISNERAT G, NARBONNE JF. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Rev Environ Contam Toxicol.* 146:53-89, 1996.
- SARDAS S, CIMEN B, KARSLI S, YURDUN T, DONBAK L. Comparison of genotoxic effect between smokeless tobacco (Maras powder) users and cigarette smokers by the alkaline comet assay. *Hum Exp Toxicol.* 28:214-9, 2009.
- SCHRODER H, HEIMERS A, FRENTZEL-BEYME R, SCHOTT A, HOFFMANN W. Chromosome Aberration Analysis In Peripheral Lymphocytes Of Gulf War And Balkans War Veterans. *Radiation Protection Dosimetry.* 103:211-19, 2003.
- SEILER RL. Temporal changes in water quality at a childhood leukemia cluster. *Ground Water.* 42, 446-455, 2004.
- SINGH MP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:184-91, 1988.
- SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA – SBPC. CNEN estuda radiação natural de Monte Alegre. Assessoria de Comunicação da CNEN, *Jornal da Ciência*, 2003.
- SOMLAI J, GORJÁNÁ CZ Z, VÁRHEGVI A, KOVÁCS T. Radon concentration in houses over a closed Hungarian uranium mine. *Sci Total Environ.* 367:653-65, 2006.
- STEARNS DM, YAZZIE M, BRADLEY AS, CORYELL VH, SHELLEY JT, ASHBY A, ASPLUND CS, LANTZ RC. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis.* 20:417-23, 2005.

- SURRALLÉS J, XAMENA N, CREUS A, MARCOS R. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res.* 342:43-59, 1995
- SWIERENGA SHH, HEDDLE JA, SIGAL EA, GILMAN JPW, BRILIINGER RL, DOUGLAS GR, NESTMANN ER. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 246:301-22, 1991.
- TAULAN M, PAQUET F, MAUBERT C, DELISSEN O, DEMAILLE J, ROMEY MC. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect.* 112:1628-35, 2004.
- TAYLOR CP, MCGUCKIN AG, BOWN NP, REID MM, MALCOLM AJ, PEARSON AD, SHEER D. Rapid detection of prognostic genetic factors in neuroblastoma using fluorescence in situ hybridisation on tumour imprints and bone marrow smears. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Br J Cancer.* 69:445-51, 1994.
- THIÉBAULT C, CARRIÈRE M, MILGRAM S, SIMON A, AVOSCAN L, GOUGET B. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52<sup>E</sup>) proximal cells. *Toxicol Sci.* 98:479-487, 2007.
- THIERENS H, VRAL A, MORTIER R, AOUSALAH B, DE RIDDER L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis.* 15:245-249, 2000.
- TICE RR, STRAUSS GH. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells.* 13:207-14, 1995.
- UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) 2006 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes A and B. Effects of Ionizing Radiation. United Nations. Volume 1. Vienna, 2008.
- URNOVITZ HB, TUIITE JJ, HIGASHIDA JM, MURPHY WH. RNAs in sera of Persian Gulf War veterans have segments homologous to chromosome 22q11.2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6:330-335, 1999.
- VRAL A, THIERENS H, DE RIDDER L. In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 71:61-68, 1997.
- WAN B, FLEMING JT, SCHULTZ TW, SAYLER GS. In vitro immune toxicity of depleted uranium: Effects on murine macrophages, CD4<sup>+</sup> T cells, and gene expression profiles, *Environ Health Perspect* 114:85-91, 2006.

YAZZIE M, GAMBLE SL, CIVITELLO ER, STEARNS DM. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem Res Toxicol.* 16:524-530, 2003.

ZHANG Q, ZHOU XD, DENNY T, OTTENWELLER JE, LANGE G, LA MANCA J J, LAVIETES MH, POLLET C, GAUSE WC, NATELSON BH. Changes in immune parameters seen in Gulf War veterans but not in civilians with chronic fatigue syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6:6-13 1999.

**ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO PARA SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS**  
(Projeto Urânio CNPq/Processo: 409826/2006-5)

**DADOS PESSOAIS**

1. NOME: \_\_\_\_\_
2. Data do seu nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ Qual a sua idade? \_\_\_\_\_ (anos)
3. Sexo:  masculino  feminino
4. Qual a sua etnia (raça)  
 branca  negra  indígena  japonesa  outro oriental  mestiço: \_\_\_\_\_
5. Qual o seu estado civil?  
 casado  solteiro  divorciado  separado  viúvo  amigado  
Quantos filhos naturais você tem? \_\_\_\_\_
6. Telefone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

**DADOS DE RESIDÊNCIA**

7. Endereço atual: \_\_\_\_\_  
Tempo que reside nesse endereço: \_\_\_\_\_
8. Endereço anterior (nos últimos 10 anos): \_\_\_\_\_  
Tempo que residiu nesse endereço: \_\_\_\_\_
9. Endereço anterior (nos últimos 10 anos): \_\_\_\_\_  
Tempo que residiu nesse endereço: \_\_\_\_\_

**DADOS DE OCUPAÇÃO**

10. Profissão atual: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_  
Profissão anterior: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_  
Profissão anterior: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_
11. Se agricultor, indicar o local das últimas lavouras: \_\_\_\_\_

**HISTÓRICO DE EXPOSIÇÃO**

12. Você se expõe ou se expôs a alguns dos agentes abaixo, marque com um X:

		Quando foi a 1ª exposição? (anos, meses)	Quando foi a sua última exposição? (anos, meses)	Por quanto tempo você se expôs? (dias, meses ou anos)
Radiação: raios-X	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Trabalha exposto ao sol	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Resíduos de madeira, metais, carvão	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Pesticidas e herbicidas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Derivados de	<input type="checkbox"/> sim			

petróleo	<input type="checkbox"/> não			
Corantes: tintas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Solventes	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Outros químicos	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Pó de minas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			

**TABAGISMO**

13. Você fuma?

a.  nunca fumoub.  ex-fumante ou  fumante ativo

b.1. Que idade começou a fumar: \_\_\_\_\_

b.2. Fuma (ou fumou) por quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos e \_\_\_\_\_ meses

b.3. Quantos maços você fuma por dia?

 menos do que ½ maço  entre ½ e 1 maço  mais do que 1 maço Quantos: \_\_\_\_\_b.4. Você fuma cigarros com filtro?  sim  não

b.5. Qual a marca dos cigarros que você fuma?: \_\_\_\_\_

c. Você convive com quem fuma em ambientes fechados?  residência  trabalho

Quantas horas por dia? \_\_\_\_\_ h Quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos e \_\_\_\_\_ meses

d. Você mastiga tabaco frequentemente?  sim  não Qual a frequência? \_\_\_\_\_e. Você cheira tabaco?  sim  não Qual a frequência? \_\_\_\_\_**DROGAS MEDICAMENTOSAS**

14. Você tomou algum medicamento prescrito por um médico no último ano?:

 sim  não. Se a resposta for sim, indicar:

Tipo de medicamento	Dose	Quantas vezes por dia?	Tempo de uso	
			Início	Fim

15. Você tomou algum remédio não prescrito por médico no último ano?

 sim  não. Se a resposta for sim, indicar:

Tipo de medicamento	Dose	Quantas vezes por dia?	Tempo de uso	
			Início	Fim

16. Você toma ou tomou alguma vitamina ou suplemento vitamínico nos últimos 6 meses?

 sim  não. Se a resposta for sim, indicar:

Tipo da vitamina ou nome do suplemento	Dose	Qual a frequência por semana?

**AVALIAÇÃO DA SAÚDE**

17. Você já teve ou tem alguma das doenças abaixo:



Outras								
--------	--	--	--	--	--	--	--	--

26. Você usa adoçante?  sim  não. Quanto por dia? \_\_\_\_\_
27. Você toma refrigerante ou suco “diet/light”?  sim  não. Quanto? \_\_\_\_\_
28. Você toma café?  sim  não. Quantas xícaras por dia? \_\_\_\_\_
29. Você toma chá?  sim  não. Quantas xícaras por dia? \_\_\_\_\_
30. Você toma cerveja?  sim  não. Se consome ou consumiu, responda abaixo:  
 1 a 6 garrafas ou latas por semana  
 7 a 12 garrafas ou latas por semana  
 13 a 24 garrafas ou latas por semana  
 mais do que 24 garrafas ou latas por semana  
 Idade de início do consumo semanal: \_\_\_\_\_
31. Você toma vinho?  sim  não. Se sim, responda abaixo:  
 1 a 4 copos por semana  
 5 a 8 copos por semana  
 9 a 16 copos por semana  
 mais do que 16 copos por semana  
 Idade de início do consumo semanal: \_\_\_\_\_
32. Você toma outras bebidas fora cerveja e vinho?  sim  não. Se sim, responda qual é o tipo de bebida: \_\_\_\_\_. Qual o consumo médio?  
 1 a 4 copos por semana  
 5 a 8 copos por semana  
 9 a 16 copos por semana  
 mais do que 16 copos por semana  
 Idade de início do consumo semanal: \_\_\_\_\_
- HISTÓRICO GENÉTICO**
33. Você tem alguém em sua família com alguma doença genética?  sim  não  
 Se a resposta for sim, especifique qual a doença e o parente doente: \_\_\_\_\_
34. Você e seu marido/esposa têm dificuldade para ter filhos?:  sim  não
35. Você tem algum filho ou filha com alguma alteração ou doença genética?:  sim  não  
 Se a resposta for sim, especifique a criança e a doença: \_\_\_\_\_
36. O casal teve algum caso de aborto?  sim  não
37. Você tem filhos gêmeos idênticos ou fraternos?  sim  não
38. Caso você seja selecionado nesta pesquisa, para estabelecimento de possíveis danos biológicos (no DNA) causados pela exposição ao urânio, concordaria em ceder material biológico (sangue e amostra da mucosa oral), necessários para esclarecimento de possível enfermidade?  sim  não

---

Assinatura do Sujeito da pesquisa ou responsável

---

Assinatura do Sujeito que colheu o questionário

**Anexo 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

**PROJETO:** Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos e carcinogênicos do Urânio como indicador de risco à saúde de residentes dos municípios de Prainha, Monte Alegre e Alenquer.

A Universidade Federal do Pará está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e carcinogênicos da exposição humana ao urânio na província mineral da bacia amazônica, Estado do Pará, entre os municípios de Prainha, Alenquer e Monte Alegre. Esta pesquisa será realizada pelo monitoramento dos habitantes desta região através da identificação de possíveis alterações genéticas (cromossomos e genes) em linfócitos obtidos de amostra de sangue periférico e em de células obtidas de amostras da mucosa oral.

Você está sendo admitido(a) nesta pesquisa, para estabelecimento de possíveis danos biológicos (no DNA) causados pela exposição ao urânio e, para tal, há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à enfermidade. Parte do material retirado é encaminhado para exames laboratoriais, necessários para a investigação. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção da amostra de sangue e da mucosa oral para a pesquisa não implicará em riscos adicionais para sua saúde. A amostra de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação à pesquisa, por gentileza, entre em contato com a Prof. Rommel Burbano, pelo telefone 3211-1727 ou 88027972.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome: Rommel Mario Rodriguez Burbano

End: Trav. São Pedro 638, apto 1203, Ed. Central – Bairro: Batista Campos – CEP:66023570

Fone: 8835-7972.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura do Sujeito da pesquisa ou do responsável.

---

Assinatura do Sujeito que colheu o TCLE

---

Assinatura da testemunha (em caso de Menor)

**ANEXO 3 – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

**PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

1. **Protocolo:** N°002/2007-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS GENOTÓXICOS E CARCINOGENÉTICOS DO URÂNIO COMO INDICADOR DE RISCO À SAÚDE DE RESIDENTES DOS MUNICÍPIOS DE PRAINHA, MONTE ALEGRE E ALENQUER.
3. **Pesquisador Responsável:** Rommel Mario Rodriguez Burbano.
4. **Instituição / Unidade:** CCB/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 02/01/2007.
6. **Data do Parecer:** 09/01/2007.

**PARECER**

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 09 de janeiro de 2007.

**Profº Teiichi Oikawa**  
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

## ANEXO 4 - TERMO DE CONCESSÃO E ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO



000000025120077

### TERMO DE CONCESSÃO E ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROJETO DE PESQUISA DE AUXÍLIO PESQUISA

CONCEDENTE:

**NOME:**

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

**CNPJ/ME:**

33.654.831/0001-36

**BENEFICIÁRIO:**

**NOME:**

Rommel Mario Rodríguez Burbano

**CPE/ME:**

25705954204

1. FINALIDADE:

Concessão de Auxílio Financeiro à Pesquisa para apoio a projeto de pesquisa científica e/ou tecnológica.

**1.1 TÍTULO DO PROJETO/PLANO DE TRABALHO:**

Avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos e carcinogênicos do Urânio como indicador de risco à saúde de residentes dos municípios de Prainha, Monte Alegre e Alenquer

**1.2 IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO:**

**NÚMERO:**

409826/2006-5

**CHAMADA:**

Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 24/2006- Estudos em Populações Expostas à Contaminação Ambiental

2. VALOR GLOBAL DA CONCESSÃO E DISCRIMINAÇÃO ORÇAMENTÁRIA:

**BOLSAS DE CURTA DURAÇÃO:**

VALOR: R\$

**BENEFÍCIOS DE BOLSAS DE CURTA DURAÇÃO:**

VALOR: R\$

**AUXÍLIO FINANCEIRO:**

CUSTEIO : R\$

142.926,40

CAPITAL : R\$

70.000,00

**VALOR DA CONCESSÃO:**

VALOR: R\$

R\$ 212.926,40

**AUXÍLIO FINANCEIRO - CUSTEIO ( ano 2006 - 2008 )**

Valor:

R\$ 142.926,40

## Cytogenetic biomonitoring of inhabitants of a large uranium mineralization area: the municipalities of Monte Alegre, Prainha, and Alenquer, in the State of Pará, Brazil

Adriana Costa Guimarães · Lusânia Maria Gregg Antunes ·  
Helem Ferreira Ribeiro · Ândrea Kelly Ribeiro dos Santos ·  
Plínio Cerqueira dos Santos Cardoso · Patrícia Lima de Lima ·  
Aline Damasceno Seabra · Thaís Brilhante Pontes · Claudia Pessoa ·  
Manoel Odorico de Moraes · Bruno Coelho Cavalcanti ·  
Carla Maria Lima Sombra · Marcelo de Oliveira Bahia ·  
Rommel Rodríguez Burbano

Received: 18 May 2009 / Accepted: 20 January 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Uranium is a natural radioactive metallic element; its effect on the organism is cumulative, and chronic exposure to this element can induce carcinogenesis. Three cities of the Amazon region—Monte Alegre, Prainha, and Alenquer—in North Brazil, are

located in one of the largest uranium mineralization areas of the world. Radon is a radioactive gas, part of uranium decay series and readily diffuses through rock. In Monte Alegre, most of the houses are built of rocks removed from the Earth's crust in the forest, where the uranium reserves lie. The objective of the present work is to determine the presence or absence of genotoxicity and risk of carcinogenesis induced by natural exposure to uranium and radon in the populations of these three cities. The frequency of micronuclei (MN) and chromosomal aberrations (CA) showed no statistically significant differences between the control population and the three study populations ( $P > 0.05$ ). MN was also analyzed using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, with a centromere-specific probe. No clastogenic and/or aneugenic effects were found in the populations. Using FISH analysis, other carcinogenesis biomarkers were analyzed, but neither the presence of the *IGH/BCL2* translocation nor an amplification of the *MYC* gene and 22q21 region was detected. Clastogenicity and DNA damage were also not found in the populations analyzed using the alkaline comet assay. The mitotic index showed no cytotoxicity in the analyzed individuals' lymphocytes. Once we do not have data concerning radiation doses from other sources, such as cosmic rays, potassium,

---

A. C. Guimarães · H. F. Ribeiro · Â. K. R. dos Santos ·  
P. C. dos Santos Cardoso · P. L. de Lima · A. D. Seabra ·  
T. B. Pontes · M. de Oliveira Bahia · R. R. Burbano (✉)  
Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará,  
Belém, Pará, Brazil  
e-mail: rommel@ufpa.br

C. Pessoa · M. O. de Moraes · B. C. Cavalcanti ·  
C. M. L. Sombra  
Department of Physiology and Pharmacology,  
School of Medicine, Federal University of Ceará,  
Fortaleza, Ceará, Brazil

L. M. G. Antunes  
Department of Clinical, Toxicological,  
and Bromatological Analysis, School of Pharmaceutical  
Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo,  
Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

R. R. Burbano  
Laboratório de Citogenética Humana, ICB,  
Universidade Federal do Pará,  
Campus Universitário do Guamá,  
Rua Augusto Corrêa 01,  
CEP 66075-110 Belém, Pará, Brazil

thorium, or anthropogenic sources, it is hard to determine if uranium emissions in this geographic region where our study population lives are too low to cause significant DNA damage. Regardless, genetic analyses suggest that the radiation in our study area is not high enough to induce DNA alterations or to interfere with mitotic apparatus formation. It is also possible that damages caused by radiation doses undergo cellular repair.

**Keywords** Populational biomonitoring · Uranium · Genotoxicity · Carcinogenesis

### Abbreviations

DU	Depleted uranium
CAs	Chromosomal aberrations
MN	Micronuclei
FISH	Fluorescence in situ hybridization
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
MI	Mitotic index

### Introduction

Uranium is a natural radioactive heavy metal (Chazel et al. 2000). The municipality of Monte Alegre, located in northern Brazil, in the Brazilian Amazon, at 2° 00' 24.9" S; 54° 04' 13.5" W, possesses one of the largest uranium mineralization areas in the world, over 800 km<sup>2</sup>, extending to the municipalities of Alenquer and Prainha (Fig. 1).

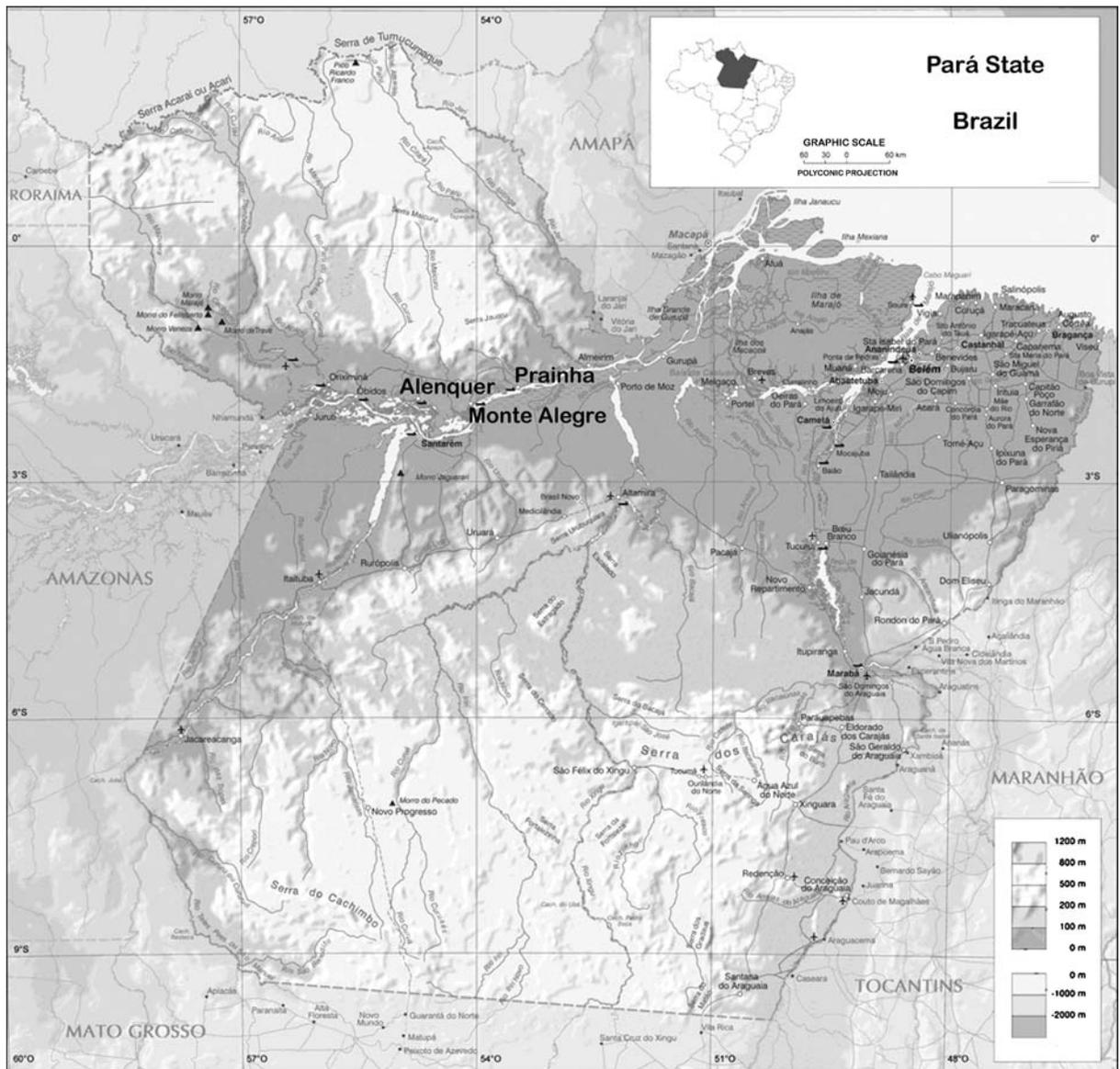
Most of the radioactivity in the atmosphere at sea level is attributable to two isotopes of radon (<sup>222</sup>Rn and <sup>220</sup>Rn) and their daughters. The <sup>222</sup>Rn is part of the uranium series decay (U<sup>238</sup>). The <sup>222</sup>Rn is an alpha emitting noble gas that readily diffuses through rock and emanates continuously from the walls, floor, and ceilings of the mine shaft (Kathren 1984). In Monte Alegre, most of the houses are built of rocks removed from the Earth's crust in the forest, where the uranium reserves lie at a depth of only 20 m. Among the region rocks, uranium is more abundant in the black shales, but at low tenors (35 ppm of U<sup>3</sup>O<sup>8</sup>; Pereira et al. 1983). The use of such rocks for house building is a major form of chronic exposure to ionizing radiations, especially to the radioactive gas <sup>222</sup>Rn that is released by the black shales. The <sup>222</sup>Rn concentration inside the houses built in the Monte

Alegre region ranged from 88±80 to 338±19 Bq m<sup>-3</sup> (mean concentration 116±84 Bq m<sup>-3</sup>). In other Amazonian areas outside our study region, the mean concentration of radon inside the houses was considerably lower (28±3 Bq m<sup>-3</sup>; Melo 1999).

Most toxicological studies regarding uranium have reported that it is its activity as a heavy metal, rather than radiation, that causes health effects. Primary health effects to human health caused by uranium intoxication are renal failure, development problems, delayed bone growth, and DNA damage (Brugge et al. 2005). Radon and its decay products are well established as lung carcinogens. However, the doses to other organs and tissues arising from inhalation of radon and its decay products are quite small, usually at least an order of magnitude smaller than the doses to the lung. Epidemiological data available so far point to an increased mortality risk due to lung cancer than due to any other causes (BEIR VI Report 1999; UNSCEAR 2008).

Human exposure to uranium has occurred mainly through mining and processing of ore for nuclear power and weapons (Brugge et al. 2005). Exposure to uranium has occurred also during the Gulf and the Balkans Wars, where depleted uranium (DU) was used to manufacture weapon ammunition (GAO 2000). DU is a byproduct of the nuclear industry (Bailey et al. 2008; NRC 2008). The main findings were that war veterans are suffering from a wide variety of recognized illnesses, but no new or unique syndrome was identified (Department of Veterans Affairs 2002). In blood cells from Gulf War veterans, the presence of amplicons was reported, with sequences homologous to the chromosomal region 22q11.2, suggesting that an exposure to environmental genotoxin, as uranium, induced amplification of this DNA sequence (Urnovitz et al. 1999).

The frequency of chromosomal aberrations (CAs) and micronuclei (MN) in peripheral blood lymphocytes has been used as a biomarker to detect early effects of radiation (Norppa et al. 2006; Bonassi et al. 2007). Populations exposed to DU in Bosnia and Herzegovina showed increased MN (Ibrulj et al. 2004; Krunic et al. 2005) and CA (Ibrulj et al. 2007) frequencies compared to control populations, suggesting that DU could be a risk factor for human health. By using fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric probe, it is possible to distinguish between MN originated from chromosome



**Fig. 1** Map of the study region: The *arrow* points to the city of Monte Alegre, next to which lie the municipalities of Alenquer and Prainha (adapted from <http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/mapas/index.html>)

breakage (C–MN) and MN originated from chromosome malsegregation (C+MN) due to spindle or kinetochore malfunction during mitosis (Fenech et al. 1997). MN analysis using FISH was used in genotoxicology studies including studies in uranium miners (Kryscio et al. 2001).

Another assay used for human biomonitoring radiobiology studies is alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay; Olive 1999; Tice and Strauss 1995). Monleau et al. (2006) used the comet assay in neutral

conditions and demonstrated that inhalation of DU produced DNA double strand breaks in bronchoalveolar lavage cells of rats, suggesting that radiation could contribute to DU genotoxic effects in vivo.

Genotoxic agents such as pesticides and ionizing radiation can induce the development of acute lymphoblastic leukemia (ALL). The chromosomal translocation  $t(14;18)(q32;q21)$  is a genetic marker associated with the risk of developing ALL (Chiu et al. 2006, 2008). This translocation can be found in the peripheral blood

of individuals exposed to genotoxic agents (McHale et al. 2008). Translocation t(14;18) links the *BCL-2* gene located on chromosome 18 to the gene for the immunoglobulin (IgH) heavy chain located on chromosome 14, resulting in inhibition of apoptosis by overexpression of gene *BCL-2* (Korsmeyer 1999; Meijerink 1997).

Another marker that can be used in human biomonitoring studies is the oncogene *MYC*. Amplification of the *MYC* oncogene has been described as a key element of several carcinogenesis processes in humans (Calcagno et al. 2008). Cell lines derived from mammary glands of irradiated mice showed amplification of the *MYC* oncogene (Au 1993).

The present work has the purpose of evaluating the possible cytotoxic, genotoxic, clastogenic, and carcinogenic effects of human exposure to uranium in the municipalities of Prainha, Alenquer, and Monte Alegre. Such effects were assessed by determining the mitotic index (MI), CAs, conventional and FISH MN frequency, translocation *IGH/BCL2* and amplification of 22q11.2 and *MYC* by FISH, and DNA damage index detected by the comet assay.

## Materials and methods

### Subjects

A total of 65 individuals from Monte Alegre-PA, 51 individuals from Prainha-PA, and 48 individuals from Alenquer-PA participated in the study. Once the three cities in this study present a large rural area, where most of the houses have neither address records nor telephones, the volunteers were invited to participate in this work through announcements in the local radio. Due to the difficulties to access the study area, the volunteers were selected from a convenient sample. Only individuals that lived in the study region for 15 years continuously and did not leave it for more than 6 months or that had worked or lived in places built with rocks from the uranium mineralization area met our inclusion criteria. They all signed an informed consent form. Peripheral blood samples were obtained by venipuncture into heparinized vials (5,000 IU/ml; Liquémine; Roche).

Genotoxicity assessment was performed in 143 individuals. Reasons for nonparticipation were culture contamination. Thus, 47 individuals from Monte Ale-

gre, 28 from Prainha, and 21 from Alenquer participated in the study. A group of 47 individuals from other two Brazilian cities, Santarém e Ribeirão Preto, over 100 and 2,000 km away from our study area, respectively, were used as control. Those cities do not present records of natural radioactivity, and this control subjects present no family records for cancer and never worked in clinical radiology services. This study was approved by the Ethics Committee of Núcleo de Medicina Tropical (002/2007-CEP/NMT). Participants were invited to answer questions about some personal data and their lifestyles (dietary habit, tobacco smoking, alcohol consumption, and drug use), based on a modified version of the Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens Questionnaire (Carrano and Natarajan 1988). Recent X-ray exposure was also considered as an exclusion factor, and patients with any radiation exposure in the past 6 months before the study were not included. The volunteers had similar dietary habits in all the three cities because all the subjects live in rural areas, and the kinds of food they have available are almost the same, along with meat, fruits, and vegetables intake. None of the subjects used vitamin supplements. To evaluate lifestyle factors, individuals were stratified as smokers or nonsmokers. All smokers were current smokers and had a daily cigarette intake between one and 20 cigarettes.

Table 1 shows that age and gender distribution were similar in the exposed and the control population. The number of smokers in the exposed and in the nonexposed control groups was not statistically different ( $P > 0.05$ ).

### Chromosomal aberration assay in lymphocytes

Short-term lymphocyte cultures were set up according to a standard protocol (Preston et al. 1987). The culture medium consisted of 5 ml HAM-F10 (78%), heat-inactivated fetal calf serum (20%), phytohemagglutinin-M (2%), and antibiotics [0.01 mg/ml of penicillin (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) and 0.005 mg/ml of streptomycin (USB, Cleveland, OH, USA)]. The culture tubes were incubated at 37°C for 70 h. For cytogenetic analysis, cells were treated with colchicine for 2 h to enrich metaphase count in cell cultures. After a total culture time of 72 h, the cells were treated with hypotonic 0.075 KCl solution for about 20 min at 37°C and fixed with methanol/acetic acid (3:1). Slides were submitted to standard staining with Giemsa.

**Table 1** Demographic characteristics of the studied population

	Control	Monte Alegre	Prainha	Alenquer	Total
Sample size	47	47	28	21	143
Age (years)					
Mean±S.D.	33.15±9.15	33.2±10.3	35.64±11.07	35.90±10.58	34.47±10.27
Range	19–60	20–60	19–56	21–52	19–60
Gender					
Female (%)	9 (19.15)	11 (23.4)	8 (28.57)	5 (23.81)	33 (23.07)
Male (%)	38 (80.85)	36 (76.6)	20 (71.43)	16 (76.19)	110 (76.93)
Smoking status					
Nonsmoker (%)	41 (87.23)	39 (82.98)	21 (75.00)	17 (80.05)	118 (82.51)
Smoker (%)	6 (12.77)	8 (17.02)	7 (25.00)	4 (19.05)	25 (17.49)

### Conventional cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes

The MN assay was performed using the cytochalasin B technique (Fenech and Morley 1985). Lymphocytes were cultured as described above. Cytochalasin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 3 µg/ml was added at 44 h of incubation. After a total of 72 h at 37°C, cells were harvested by centrifugation, rinsed, submitted to a mild hypotonic treatment, and immediately fixed with methanol/acetic acid. Slides were prepared according to standard cytogenetic procedures and stained with 4% Giemsa. The slides were then coded and scored by light microscopy at ×400 magnification or ×1,000 when necessary, by a single observer. For each experiment, 2,000 binucleated lymphocytes with well-preserved cytoplasm were scored. MN was identified according to the Fenech et al. (2003) criteria. As a cytotoxicity measure, the cytokinesis-block proliferating index (CBPI) was calculated according to the following formula:  $CBPI = [MI + 2MII + 3(MIII + MIV)]/N$ , as proposed by Surrallés et al. (1995), where MI–MIV represent the number of human lymphocytes with one to four nuclei determined on 500 cells.

### Fluorescence in situ investigation

From each study population, 15 samples with the highest CA and MN frequencies were selected, and 15 control individuals were used ( $n=60$ ). Molecular cytogenetic analysis was carried out under an Olympus BX41 fluorescence microscope with double FITC/TRICT filter (Olympus, Japan), assisted by an Applied Spectral Imaging image analysis system (ASI Ltd., Israel).

To determine the presence of the *IGH/BCL2* translocation (LPH 018 Cytocell® Ltd. UK) and the amplification of the *MYC* gene (OC801-ORG ChromoTrax™, Inc. USA) and of the 22q11-12 region (SB2203-GRN ChromoTrax™, Inc. USA), cells were hybridized with digoxigenin- and/or biotin-labeled probes for specific gene/chromosome regions. FISH was applied on cells fixed in methanol/acetic acid using recently made slides, according to modified protocols (Pinke et al. 1986; Guimarães et al. 2006). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)/antifade. For each case, 200 interphase nuclei/metaphases were analyzed using the criteria of Hopman et al. (1988).

FISH analysis of MN was performed using a human pancentromeric probe labeled with biotin (1695-B Pan Centromeric Probe Biotin Cambio Ltd., UK). This probe was previously tested on metaphase chromosomes for centromere-specific labeling. Here, FISH was also applied on cells fixed in methanol/acetic acid using recently made slides, according to modified protocols (Kapka et al. 2007). MN was counterstained with DAPI/antifade. The MN present in the binucleated lymphocytes with intact cytoplasm was examined for the presence of one or more centromeric spots and was classified as centromere positive (C+MN) or centromere negative (C–MN). At least 2,000 binucleated lymphocytes were scored for each subject.

### Comet assay

A total of 118 samples were chosen (39 from Monte Alegre, 21 from Prainha, 17 from Alenquer, and 41 controls) based on the prerequisite of no recent history of

smoking (Table 1). Lymphocyte samples isolated from the controls were exposed to the chemotherapeutic drug doxorubicin (0.55  $\mu\text{M}$ ) for 3 h and evaluated as positive control. Peripheral blood lymphocytes were isolated by Ficoll density gradient (Hystopaque 1077; Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, USA), incubated for 3 h at different concentrations of  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (15, 20, and 25  $\mu\text{M}$ ) and then mixed with low-melting-point agarosis.

The alkaline version of the comet assay (single-cell gel electrophoresis) was performed as described by Singh et al. (1988), with minor modifications. Slides were prepared in duplicate, and 100 nucleoids were screened per sample (50 cells from each duplicate slide) with a fluorescence microscope (Zeiss) equipped with a 515–560-nm excitation filter, a 590-nm barrier filter, and a  $\times 40$  objective. Undamaged cells appeared as intact nuclei without tails, whereas damaged cells had the appearance of a comet. Comets were classified visually as belonging to one of five classes according to tail size and given a score of 0, 1, 2, 3, or 4 (from undamaged=0 to maximally damaged=4). Thus, the total damage score for 100 comets ranged from 0 (all undamaged) to 400 (all maximally damaged) (Speit and Hartmann 1999). The DNA damage index (DI) is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail and is considered a sensitive measure of DNA damage.

### Statistical analysis

Variables were submitted to Student's *t* test. For CA and conventional MN assay, data of normal distribution were analyzed by one-way ANOVA. Gaps were recorded but not included in the total number of chromosomal aberrations and percentage of aberrant metaphases. For the comet assay, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test, and for the FISH assay all statistical evaluations were made using a chi-squared test. The level for statistical significance (*P*) was established at 5% ( $P < 0.05$ ).

## Results

The demographic characteristics of the study subjects are listed in Table 1. There were no significant baseline differences between the control and exposed groups (Monte Alegre, Prainha, and Alenquer) with

respect to age, gender, and smoker or nonsmoker status ( $P > 0.05$ ).

### Chromosomal aberration assay in lymphocytes

Table 2 shows the mitotic index, type, and frequency of chromosomal aberrations in lymphocytes of controls and exposed individuals from Monte Alegre, Prainha, and Alenquer. No significant variations were found in MI between the study populations and the control group ( $P > 0.05$ ).

In both groups, the most frequent alterations found were chromosome and chromatid breaks. Rearrangements such as dicentric and ring chromosomes and triradial figures were rare. The frequency of structural and numerical (polyploidies and endoreduplications) CAs observed in the individuals of the control group was not statistically different from the frequency observed in the study populations. Additionally, the frequencies of chromosomal aberrations obtained stratified for both genders were not statistically different ( $P > 0.05$ ).

There was no significant difference in the frequency of CAs found in smokers and nonsmokers of the control population. The same observation was made in the study population and when comparing this habit between the groups. The percentage of aberrant metaphases was also statistically similar in all categories ( $P > 0.05$ ; Table 2).

### Conventional cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes

Table 3 shows the frequency of MN in binucleated lymphocytes and the CBPI of controls and exposed groups. The MN frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals from Monte Alegre, Prainha, and Alenquer were not higher than the ones found in the control group (1.92, 1.07, 1.48, and 2.09 MN/1,000 BC, respectively). Individuals from Monte Alegre and Prainha presented lower MN frequencies than the ones found in Alenquer and in the controls ( $P < 0.05$ ). Alenquer presented the highest MN frequency, but it was also not statistically significant when compared to controls ( $P > 0.05$ ). Most lymphocytes presented only one MN per binucleated cell.

The MN frequencies were significantly higher in the smokers of the control group and Prainha than in the nonsmoker controls and subjects from Prainha (*P*

**Table 2** Mitotic index, type, and frequency of chromosomal aberrations in lymphocytes of controls and of exposed individuals from Monte Alegre, Prainha, and Alenquer

Groups	Sample size	MI(%)	Chromosomal aberrations				Ctg	PolypI	End	Aberrant metaphases (%) <sup>a</sup>
			Ctb	Chb	Ex	Total <sup>a</sup> (%)				
Total	143	4.48	0.75	0.88	0.29	0.15	1.32	13	14	1.03±0.48
Control	47	4.60	0.64	0.95	0.23	0.17	1.36	3	2	1.12±0.40
Nonsmoker	38	4.61	0.61	0.95	0.22	0.17	1.34	1	1	1.03±0.27
Smoker	9	4.44	0.83	1.00	0.33	0.16	1.50	2	1	1.33±0.93
Monte Alegre	47	4.80	0.70	1.04	0.25	0.13	1.43	4	3	1.06±0.57
Nonsmoker	39	4.82	0.66	1.07	0.23	0.10	1.11	3	2	0.92±0.56
Smoker	8	4.66	0.85	0.85	0.37	0.25	1.55	1	1	1.09±0.54
Prainha	28	4.06	0.82	0.61	0.32	0.14	1.11	2	5	0.93±0.54
Nonsmoker	21	4.09	0.81	0.52	0.24	0.14	0.95	1	2	0.90±0.67
Smoker	7	3.99	0.86	0.86	0.57	0.14	1.57	1	3	1.14±0.38
Alenquer	21	4.01	1.00	0.71	0.48	0.14	1.33	4	4	0.90±0.30
Nonsmoker	17	4.13	1.00	0.71	0.47	0.12	1.29	3	2	1.00±0.00
Smoker	4	3.82	1.00	0.75	0.50	0.25	1.50	1	2	0.88±0.33

Cells analyzed per individual for chromosome aberrations, 100; cells were analyzed per individual for MI, 1,000

Ctg chromatid gaps, Ctb chromatid breaks, Chb chromosome breaks, Ex exchange figure, SD standard deviation, PolypI polyploid cells, End endoreduplication

<sup>a</sup>Ctg not included. Statistically nonsignificant differences among the groups ( $P>0.05$ )

**Table 3** Frequency and distribution of MN in BN and CBPI of controls and of exposed individuals from Monte Alegre, Prainha, and Alenquer

Groups	Sample size	Total BN scored	MN/1,000 cells BN	Distribution of MN			Total MN scored	CBPI
				Mean ± SD	1	2		
Total	143	283.237	1.64±0.46	435	13	0	461	1.68±0.20
Control	47	94.000	1.92±1.49	170	6	0	182	1.68±0.39
Nonsmoker	6	12.000	2.33±0.81	24	2	0	28	1.61±0.30
Smoker	41	82.000	1.86±1.40	146	4	0	154	1.73±0.18
Monte Alegre	47	91.237	1.07±0.98*	96	2	0	100	1.53±0.35
Nonsmoker	8	16.000	1.13±0.88	15	0	0	15	1.65±0.34
Smoker	39	75.237	1.06±1.15	81	2	0	85	1.51±0.27
Prainha	28	56.000	1.48±1.15*	87	3	0	93	1.54±0.19
Nonsmoker	7	14.000	2.25±1.48	45	2	0	49	1.60±0.09
Smoker	21	42.000	0.86±1.34	42	1	0	44	1.52±0.22
Alenquer	21	42.000	2.09±1.47**	82	2	0	86	1.96±0.15
Nonsmoker	17	34.000	1.75±1.40	70	1	0	72	2.15±0.29
Smoker	4	8.000	2.18±1.61	12	1	0	14	1.94±0.10

For most cases, 2,000 binucleated lymphocytes were analyzed per individual. CBPI = 500 cells per individual.

\* $P<0.05$  (statistically significant difference compared to controls); \*\* $P<0.05$  (statistically significant difference compared to Monte Alegre group)

<0.05). These groups were matched for age and gender. In the groups from Monte Alegre and Alenquer, there were no statistically significant differences between smokers and nonsmokers. The results of the CBPI index are also shown in Table 3. The CBPI index was slightly higher in the individuals from Alenquer, but the difference was not statistically significant ( $P>0.05$ ). There was no difference in the mean CBPI between the groups.

#### Fluorescence in situ investigations

The presence of an *IGH/BCL2* translocation was detected in 1.9% of the cells in the control population. The population of Prainha presented the highest value (2.5%); however, this value was considered to be a false positive, since it was below the 7% cutoff value (Jiang et al. 2002; Table 4).

Table 5 presents the number of signals by nuclei of the *MYC* gene and the 22q11-12 chromosome region. In the control population, 98% of the cells presented two signals for these two markers. The population of Monte Alegre was the one with the lowest percentage of cells with two alleles for the *MYC* gene (97.5%), while the population of Prainha showed the lowest percentage of cells with two signals for the chromosome region 22q11.2 (97.4%). These values are statistically not different from the controls and are below the 7% cutoff limit established for the single-cell DNA sequence FISH assays (Costa Raiol et al. 2008).

The frequencies of the different types of C+MN and C-MN of the exposed individuals and of the

controls are presented in Table 5. The FISH technique revealed the presence of clastogenic and aneugenic effects in the peripheral blood lymphocytes of both groups, based on the MN C+ and C- constitution. The aneugenic effect, represented by the C+MN, was slightly more pronounced than the clastogenic effect, represented by the C-MN. However, this difference was not statistically significant ( $P<0.05$ ), and the frequency of MN in the individuals of the exposed and control groups was within the expected range, i. e., part of the basal frequency of MN described by human peripheral blood lymphocytes defined as 6.5 MN/1,000 BN (Bonassi et al. 2001). There was no difference in the C+MN/C-MN proportion between the smoker and nonsmoker subgroups ( $P<0.05$ ).

#### Comet assay

The alkaline comet assay demonstrated that there was no statistical difference between the DIs of the population of Monte Alegre, Prainha, and Alenquer and of the control group ( $P>0.05$ ; Fig. 2). None of the three populations studied showed DNA damage values equal to that of the lymphocytes treated for 3 h with 0.5  $\mu$ M doxorubicin.

#### Discussion

The use of natural origin material such as soil, cement stone, limestone, fertilizers, and others for a variety of human activities can become a major additional source of chronic exposure to ionizing radiations. Since 1977, radiometric surveys and geologic characterizations performed in the region under study (Fig. 1), precisely at 20 km from the municipality of Monte Alegre, have revealed the occurrence of uranium in the rocks, resulting from mineral outcrops in the past (Pereira et al. 1983; Melo 1999). However, uranium radiation levels found in our studied region are considered low [35 ppm of  $U^{3}O^{8}$ ] when compared to levels found on other parts of the world, like Tushki and Kalabsha area, in upper Egypt, where uranium concentration varies between 591 and 2,051 ppm. Samples from Southeastern Asia and Turkey also presented higher uranium concentration of 106 and 1,353 ppm, respectively (El-Dine et al. 2004).

Melo (1999) analyzed rock and soil samples from the study region and observed that, although the

**Table 4** Number of positive and negative signals for chromosomal translocation t(14;18) by nuclei in the control group and in the exposed populations, determined by FISH in peripheral blood lymphocytes

Groups	Sample size	% t(14;18)-positive	% t(14;18)-negative	SD
Control	15	1.93 (n=58)	98.07 (n=2,942)	1.30
Monte Alegre	15	2.06 (n=62)	97.94 (n=2,938)	1.64
Prainha	15	2.23 (n=67)	97.77 (n=2,933)	1.88
Alenquer	15	2.33 (n=70)	97.67 (n=2,930)	2.02
Total	60			

Cells analyzed per individual (interphase nuclei and metaphases), 200

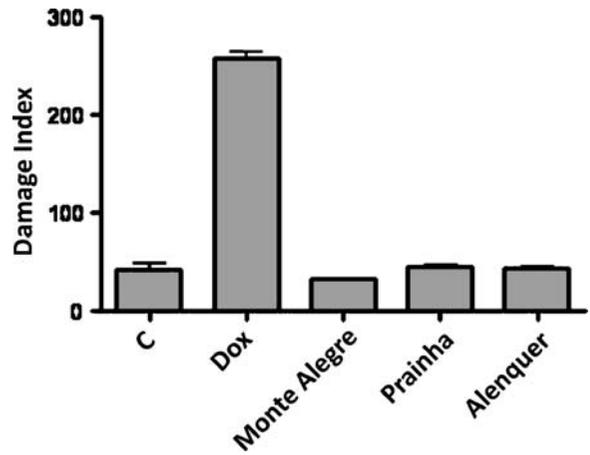
SD standard deviation

**Table 5** Number of C-MYC and 22q11.2 signals by nuclei in the control group and in the exposed populations

Groups	Sample size	% 22q11.2 (mean ± SD) <sup>a</sup>		% C-MYC (mean ± SD) <sup>a</sup>	
		1	2	1	2
Control	15	2.00±1.36 (n=60)	97.70±1.63 (n=2,931)	1.63±1.03 (n=49)	98.10±0.86 (n=2,943)
Monte Alegre	15	1.83±1.75 (n=55)	97.77±1.45 (n=2,933)	1.67±1.04 (n=50)	98.03±1.03 (n=2,941)
Prainha	15	1.70±1.45 (n=51)	97.84±1.63 (n=2,935)	2.07±1.18 (n=62)	97.5±1.30 (n=2,925)
Alenquer	15	1.87±1.87 (n=56)	97.10±2.35 (n=2,912)	2.00±1.51 (n=60)	97.60±1.57 (n=2,928)
Total	60	1.85±1.60 (n=222)	97.65±1.81 (n=11,717)	1.84±1.24 (n=221)	97.81±1.30 (n=11,737)

SD standard deviation

<sup>a</sup> Cells analyzed per individual (interphase nuclei and metaphases), 200



**Fig. 2** Analysis of DNA damage indexes in the populations of Monte Alegre, Prainha, and Alenquer by the alkaline comet assay. Nonexposed volunteers were selected as negative control (C), and the positive controls (DOX) were lymphocytes exposed to doxorubicin for 3 h. Bars represent the mean ± SD. ANOVA followed by Tukey’s test

concentrations of <sup>238</sup>U and <sup>226</sup>Ra presented values 17 times higher than those found in distant urban areas, where the houses were not built with stone removed from the uranium mineralization area, the gamma ray dose rate in the soil, measured from 20-cm distance, was on average only 1.7 times higher.

Natural uranium exposure is derived from the mining, milling, and processing of uranium ore, as well as ingestion of groundwater that is naturally contaminated with uranium. Natural uranium ore will coexist with decay products of uranium (radium, thorium, radon); however, its decay products, like thorium, have a much lower activity than uranium, but the radioactivity concentration of the two elements is about the same (Kathren 1998). Both thorium and uranium decay series include isotopes of radium, and since the average activity concentrations of thorium and uranium are equal in soil and rock, the same is true for <sup>228</sup>Ra and <sup>226</sup>Ra (UNSCEAR 1977, 1982). The domestic exposure to uranium and its decay products is an important pathway for human contamination. Chromosome analysis in peripheral lymphocytes from occupants of houses with elevated indoor radon (<sup>222</sup>Rn) concentrations (>200 Bq m<sup>-3</sup>) showed a statistically significant increase in chromosome aberrations (mainly dicentrics + ring chromosomes and translocations) when compared to control individuals (nonexposed) (Bauchinger et al. 1994; Oestreicher et al. 2004).

The ingestion of uranium-contaminated water was observed in Finland (Kurttio et al. 2006), but the cytotoxicity indicators to internal exposure to this natural radionuclide were negative, and an evaluation of the kidneys in the exposed population did not show the presence of renal dysfunction. Similarly, in this study, none of the interviewed volunteers informed the presence of renal disease (data not shown).

The cytogenetic effects of chronic exposure to low levels of radiation are so far not entirely clear (Chang et al. 1999; Miller et al. 2005). According Milacic et al. (2004), exposure to low-level doses of radiation does not influence human health directly; however, 5–10% of the populations are naturally radiosensitive, and all radioactive doses above natural levels natural can produce biological effect in such individuals.

DU, a byproduct of the uranium isotope enrichment process with low specific radioactivity (Hindin et al. 2005), can be used as a parameter for comparison. Answering war veterans' concerns and as part of an ongoing medical surveillance program for US military veterans exposed to DU, biological monitoring of urine uranium concentrations has been carried out by the Department of Veterans Affairs since the early 1990s (Army Environmental Policy Institute 1995). McDiarmid et al. (2004) and Dorsey et al. (2009) demonstrated that veterans with retained DU fragments kept high urine uranium levels compared with those without embedded fragments. Findings to date reveal that, in addition to subtle perturbations in some proximal tubular parameters, genotoxic alterations are also observed, including an association of hypoxanthine–guanine phosphoribosyl transferase mutation frequency with high urine uranium levels.

A study performed by Milacic et al. (2004), in South Serbia, an area where war ammunition was used and uranium-induced radioactivity exceeded values over 200,000 Bq, only 14% of the habitants presented urine samples contaminated by DU, but cytogenetic alterations found in these individuals were superior to the one found on their control area (non-contaminated area in central Serbia) and inferior to chromosomal aberration frequency found in occupationally exposed workers.

The cytotoxicity of DU in studies performed in vitro with different cell lines and types varies from doses of 200 to 800  $\mu\text{M}$  (Mirto et al. 1999; Carrière et al. 2004; Wan et al. 2006). NRK-52<sup>E</sup> cells undergo death by apoptosis after exposure to low doses of DU.

With high concentrations of DU, the cells underwent necrosis (Thiébaud et al. 2007). The MI of the populations of Monte Alegre, Prainha, and Alenquer did not present significant differences compared to the control population ( $P>0.05$ ). It is possible that, in the individuals analyzed, the chronic exposure to low radiation levels did not interfere with the progression of the cell cycle.

The in vitro exposure of different cell types to DU increased the frequency of MN (Miller et al. 2001a, b, 2003) and the phenotype transformation rate of the cells (Miller et al. 1998). Yazzie et al. (2003) reported that the inhaling of DU by rats can produce breaks and oxidative damage to the nitrogenated bases of the DNA. A direct interaction of DU with DNA was reported by Stearns et al. (2005) and Lin et al. (1993) in Chinese hamster ovary EM9 cells, which demonstrated that DU can form DNA adducts, MN, and CAs. Human osteoblasts also presented these alterations after exposure to DU (Miller et al. 2002, 2003).

The frequency of chromosomal aberrations and MN observed in the control group individuals was not statistically different from the frequency observed in the Monte Alegre, Prainha, and Alenquer populations ( $P>0.05$ ). The uranium emission in the geographic region where our study populations live is probably insufficient to induce breaks in the DNA molecule or to interfere with the setting up of the spindle fibers or the damage caused by the emitted radiation is susceptible to cell repair.

We also found no significant differences in the MN and CA frequencies between genders ( $P>0.05$ ). This finding is in agreement with the study of Gourabi and Mozdarani (1998), who observed that the distribution and frequency of MN in lymphocytes of individuals occupationally exposed to radiation and controls were not different when genders were compared. Joseph et al. (2004) also found no significant differences between both genders regarding the MN frequencies of individuals occupationally exposed to radiation.

The smoking habit is obviously an additional factor that can cause changes in the cellular genome. There is a synergism between tobacco smoke and exposure to radon progeny radiation (Balmes and Scannell 1995), increasing the risk of developing lung cancer tenfold to 20-fold compared to nonsmokers (IAEA 1986).

Smokers who smoke a large number of cigarettes per day ( $>20$ ) and are exposed to low levels of

radiation present a higher frequency of MN formation than exposed individuals who are nonsmokers or smoke only a small amount of cigarettes per day (Fenech 1993; Dias et al. 2007).

Mészáros et al. (2004) studied a group of 141 individuals who worked in uranium mines and were exposed to inhalation of radon progeny for different periods of time, upon termination of the mining activities and 20 years later. Chromosome analysis revealed that the aberrations found immediately after the mine decommissioning persisted in the miners' cells for a long time. Thus, the inhalation of radon and its decay products would produce long-term clastogenic effects. In our study population, we do not expect to find long-term chromosomal alterations, once currently the alterations found did not show any difference from the controls.

The FISH assay was used in an attempt to explain the origin of the MN present in the lymphocytes of the examined population. The question was whether they were induced by the aneugenic or clastogenic effects of ionizing radiation of uranium, chemicals (because the uranium is a natural heavy metal), or by smoking. Since the constitution of MN is influenced by the type of exposure as well as by biological factors (age and gender), the characterization of the MN contents is likely to be particularly important when the micronucleus assay is used for biomonitoring of human genotoxic effects (Kapka et al. 2007). Literature data support that exposure to low levels of ionizing radiation and smoking may increase micronuclei frequencies. A higher frequency of micronuclei was observed in subjects that smoked a higher number of cigarettes per day when compared with healthy nonsmokers or low-level smokers (Fenech 1993; Tsai et al. 2001). Dias et al. (2007) found difference in micronuclei frequency in the exposed smokers, when compared to control smokers exposed to low levels of ionizing radiation. Catelino et al. (2006) also estimated a higher level of predicted lung cancer deaths attributable to indoor radon exposure on smokers compared to nonsmokers.

In this investigation, we did not observe any difference in the induction of genotoxicity between smokers and nonsmokers. All our smoker subjects had low daily cigarette intake and most of them in an acute exposure. These data are in accordance with Baias et al. (2010), who determined that the effects of acute smoking even protect the lung from radiation

damage due to an increase in mucus secretion and in the thickness of this layer that can protect cells from alpha particles emitted from the gel phase of mucus layer. However, these apparent "advantages" of smoking disappear with continued exposure. Chronic exposure can induce changes in the epithelial structure, like metaplasia of the goblet cells into inflammatory cells that are located very close to the epithelium surface. The combined effect of these factors eventually increase the dose in heavy long-term smokers by about a factor of 2 relative to that of a healthy nonsmoker.

Based on the research carried out in uranium miners, it was suggested that low percentage of C+MN may be a marker of genomic instability and cancer predisposition (Kryscio et al. 2001). Our results revealed the presence of C+MN and C-MN in the study populations and in the controls (Table 5). There was no difference in the proportion of C+MN/C-MN between the study and the control populations or between the smoker and nonsmoker subgroups.

With regard to the control population, our results are similar to those of Thierens et al. (2000) and Attia (2007), who analyzed the chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow and human lymphocytes, respectively, as in these studies the controls presented no differences between the number of C+MN and C-MN either. On the other hand, in studies like those of Kryscio et al. (2001) and Kapka et al. (2007), the levels of C-MN in the individuals of the control populations were found to be significantly lower than those of C+MN.

Different results have been reported when the effect of ionizing radiation on the MN composition was analyzed. Thierens et al. (2000) studied lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to X-rays and gamma radiation using an MN centromere assay and found an increase in C+MN in the exposed individuals compared to the controls. We did not observe any increase in the number of C+MN in the study populations. Surprisingly, a previous work (Vral et al. 1997) on MN performed on cells exposed in vitro to low-dose gamma radiation showed that the radiation-induced MN were mostly C-MN, reflecting the clastogenic action of radiation. In contrast, an increase of both types of MN, C+MN and C-MN, was found by Chang et al. (1999) in individuals submitted to gamma ionizing radiation compared to the control population.

As already mentioned, so far, little is known about the effect of low-dose radiation on the exposed

individuals, the results obtained by different authors are contradictory, and further studies are necessary to determine whether the effect on MN is specific to each kind of ionizing radiation.

In the case of DU, this would mean high concentrations, as reported by Monleau et al. (2006) who, using a comet assay, detected a genotoxic effect of DU in bronchoalveolar cells of rats, but only at high concentrations. Thiébault et al. (2007), using the comet assay, detected double- and single-strand breaks and/or labile sites on the DNA, after exposure of NRK-52<sup>E</sup> cells to sublethal and lethal concentrations of DU. DNA lesions increased in direct proportion to the uranium concentration.

In our study population, the DNA molecule damage rate detected by the comet assay was not different from the one found in our control population. However, comparing these populations with the positive control (lymphocytes from the individuals, treated for 3 h with 0.5  $\mu$ M doxorubicin), they all presented a statistically significant difference ( $P < 0.01$ ). Smokers were not included in this assay because its sensitivity is high and the smoking habit is considered a confounding factor (Møller et al. 2000).

Based on the data of Monleau et al. (2006), Thiébault et al. (2007), and the present study, it seems possible that DU at low concentrations or the low radiation of natural uranium induce small lesions in the DNA, which can be efficiently repaired by the exposed cells. This assumption is consistent with the observation of Prat et al. (2005), who reported that cultured normal human kidney cells exposed to low concentrations of DU return to the normal status, whereas contamination with high concentrations leads them to irreversible cell death (Prat et al. 2005).

In the present work, individuals of the study populations presenting a greater amount of CA, even if not exceeding 5% of the analyzed cells, were compared with controls for three carcinogenesis gene markers. Urnovitz et al. (1999) suggested that genetic alterations in the 22q11.2 region, possibly induced by exposure to environmental genotoxins, as uranium, during the Persian Gulf War, may have played a role in the pathogenesis of the Gulf War Syndrome. However, in our study population, FISH analysis did not reveal an increased number of copies of this chromosome region.

The *MYC* gene did not present an increase in the number of alleles in the analyzed individuals either.

*MYC* is generally recognized as an important regulator of apoptosis (Meyer et al. 2006). In vivo studies, performed in rats and mice, demonstrated that DU alters gene expression, particularly of genes involved in apoptosis (Taulan et al. 2004; Monleau et al. 2006; Wan et al. 2006). In human renal cells, the expression of genes related to apoptosis was also reported to be altered after exposure to DU (Prat et al. 2005). Amplification of a wild-type *MYC* protein is sufficient to lead to cellular transformation in vitro and tumorigenesis in vivo (Chung and Levens 2005).

The third marker studied in the present work was the presence of t(14;18)(q32;q21), which fuses genes *IGH* and *BCL-2* and characterizes acute lymphoblastic leukemia. This *IgH/BCL2* rearrangement results in overexpression of the *BCL-2* oncogene, which is thought to result in neoplasia by interfering with the normal apoptosis of B lymphocytes (Jiang et al. 2002).

The presence of this aberration is however not sufficient for the development of acute lymphoblastic leukemia, once it can also be found in nonneoplastic cells (Janz et al. 2003; Brassesco 2008). However, the increased survival of B cells allows the accumulation of the DNA damage, favoring the development of acute lymphoblastic leukemia (Liu et al. 1994; Bäsbeck et al. 2002).

A number of cases of acute lymphocytic leukemia above the expected for that population were found in the town of Fallon, NE, USA. In that region, measurements performed in wells detected gross-alpha radioactivity and increased arsenic, radon, and uranium concentrations (Seiler 2004). In another study (Axelson et al. 2002), cases of acute lymphocytic leukemia were identified between 1980 and 1989 in individuals under the age of 20 years in a region of Sweden. The presence of uranium was detected in the concrete used to build houses. The results of this epidemiologic study suggest risk of acute lymphocytic leukemia from indoor ionizing radiation among children and young adults.

We did not find t(14;18)(q32;q21) in more than 5% of the analyzed cells, in either the individuals of the population exposed to uranium or the controls. According to Jiang et al. (2002), values below 7% can be considered false positives, even though Brassesco (2008) suggested that different lymphoma/leukemia-associated rearrangements, such as *IGH/BCL2*, can be found in a small percentage of cells of healthy individuals, without apparent oncogenic consequences.

**Table 6** Frequency of MN signals determined by FISH in 1,000 BN per sample of the three study populations and of the control group, by smoking habits

Groups	Sample size	Number of MN/1,000 BN (mean $\pm$ S.D.)			
		Total MN	C+MN	C-MN	C+MN(%) / C-MN(%)
Exposed	60	2.03 $\pm$ 0.72	1.07 $\pm$ 0.61	0.96 $\pm$ 0.43	52.67/47.33
Nonsmoker	41	1.94 $\pm$ 1.79	0.96 $\pm$ 0.68	0.98 $\pm$ 0.51	49.69/50.31
Smoker	19	2.21 $\pm$ 0.48	1.18 $\pm$ 0.34	1.03 $\pm$ 0.31	53.57/46.43
Control	15	1.83 $\pm$ 0.52	0.97 $\pm$ 0.13	0.86 $\pm$ 0.48	52.73/47.27
Nonsmoker	10	1.85 $\pm$ 0.63	0.95 $\pm$ 0.16	0.90 $\pm$ 0.57	51.35/48.65
Smoker	5	1.80 $\pm$ 0.27	1.00 $\pm$ 0.00	0.80 $\pm$ 0.27	55.56/44.44
Total	65				

Statistically nonsignificant differences among the groups ( $P > 0.05$ )

C-MN MN containing acentric chromosome fragment signals, C+MN MN containing one or more whole chromosome signals

Although the number of cells analyzed, in the different techniques used in this work (Tables 2, 3, 4, 5, and 6), is in compliance with a few genotoxicity studies protocols, it was not high enough to enable a better assessment, mainly in the methodologies that needed cell culture, such as the CA and MN analysis. As mentioned before, the lymphocyte cultures were performed in the study region, located in a large rural area, where the conditions were not optimal to obtain a number of cells higher than the one presented in this work.

For this kind of study, which includes cytogenetic analysis, the sample size of 143 individuals (96 of the study population and 47 control individual) is appropriate, like the study conducted by Wolf et al. (2004), which allowed the detection of differences between 95 uranium and coal miners and 23 control individuals. However, for the study of another kind of association, such as the identification of interindividual differences in environmental cancer risk assessment (Ketelslegers et al. 2008), the sample size of this present study may be considered small.

The mean radiation emitted in the homes built with uraniferous rocks in Monte Alegre was  $116 \pm 84$  Bq m<sup>-3</sup>, a value that is slightly above half the maximum value established by the ICRP (1993), which recommends radiological intervention for values varying from 200 to 600 Bq m<sup>-3</sup>. Thus, the values measured in Monte Alegre would not represent risks to the population's health from the viewpoint of radiological protection. Our results corroborate the limits established by the ICRP. Given the lack of

records in the control cities and the relatively low exposure in the exposed cities, a possible explanation for the absence of genotoxic effects found and that must be considered is that exposure to uranium did not differ substantially between these cities.

On the other hand, the populations studied in this work come from a rural area, where a great amount of vegetables and fruit are consumed. We could hypothesize that substances which are part of the composition of this kind of food might have exerted a protective effect against radiation.

Irradiation of the human body from external sources is mainly by  $\gamma$  radiation from radionuclides in the uranium (<sup>238</sup>U) and thorium (<sup>232</sup>Th) series and from potassium (<sup>40</sup>K). Natural uranium exposure might be enhanced by these radionuclides and their progeny (UNSCEAR 2008). In the mining industry, workers may be exposed to enhanced natural radiation. In some mines, thorium and uranium are the principal nuclides of concern in occupational radioprotection programs. In others, the main problem is radon exposure (Lipsztein et al. 2001). We do not have data concerning radiation doses from other sources, like cosmic rays, <sup>40</sup>K, <sup>232</sup>Th, or anthropogenic sources, but the purpose of the present study is to evaluate potential DNA damage caused by chronic exposure to radiation.

Although it is hard to determine if the exposure to uranium-produced radiation, in the geographic region where the studied population lives, is too low to cause significant DNA damage, the analyses used in this work did not detect genetics alterations or interference

in the setting up of the spindle fibers and to impair the progression of the cell cycle in the Prainha, Monte Alegre, and Alenquer volunteers cells. Another possibility is that the radiation of natural uranium induces DNA lesions, which can be efficiently repaired by the exposed cells.

**Acknowledgements** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Process 409826/206-5. R. R. Burbano has a PQ-2 fellowship (number 308256/2006-9) granted by CNPq. We would like to thank Dr. Vicente de Paula Melo for the access to his master's thesis.

**Conflicts of interest** There is no conflict of interest.

## References

- Army Environmental Policy Institute. Health and Environmental Consequences of Depleted Uranium Use in the US Army. Atlanta, GA: Army Environmental Policy Institute. 1995.
- Attia SM. Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with rifampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence in situ hybridization with pancentromeric DNA probe. *Toxicology*. 2007;235:112–8.
- Au WW. Abnormal chromosome repair and risk of developing cancer. *Environ Health Perspect*. 1993;101:303–8.
- Axelsson O, Fredrikson M, Akerblom G, Hardell L. Leukemia in childhood and adolescence and exposure to ionizing radiation in homes built from uranium-containing alum shale concrete. *Epidemiology*. 2002;13:146–50.
- Baias PF, Hofmann W, Winkler-Heil R, Cosma C, Dului OG. Lung dosimetry for inhaled radon progeny in smokers. *Radiat Prot Dosimetry*. 2010;138: 111–8.
- Bailey MR, Beral V, Clayton B, Darby SC, Goodhead DT, Hendry JH, et al. The health hazards of depleted uranium munitions. 2001. <http://royalsociety.org/displaypagedoc.asp?id=11496>. Accessed 14 October 2008.
- Bäsecke J, Griesinger F, Trümper L, Brittinger G. Leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *Ann Hematol*. 2002;81:64–75.
- Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H, Kulka U. Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from occupants of houses with elevated indoor radon concentrations. *Mutat Res*. 1994;310:135–42.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, et al. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*. 2001;37:31–45.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007;28:625–31.
- Brassco MS. Leukemia/lymphoma-associated gene fusions in normal individuals. *Genet Mol Res*. 2008;7:782–90.
- Brugge D, de Lemos JL, Oldmixon B. Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review. *Rev Environ Health*. 2005;20:177–93.
- Calcagno DQ, Leal MF, Assumpção PP, Smith MA, Burbano RR. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008;14:5962–8.
- Carrano AV, Natarajan AT. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*. 1988;204:379–406.
- Carrière M, Avoscan L, Collins R, Carrot F, Khodja H, Ansoborlo E, et al. Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2004;17:446–52.
- Cateliniois O, Rogel A, Laurier D, Billon S, Hemon D, Verger P, Tirmarche M. Lung cancer attributable to indoor radon exposure in France: impact of the risk models and uncertainty analysis. *Environ Health Perspect*. 2006;114:1361–6.
- Chang WP, Hsich WA, Chen DP, Lin YP, Hwang JS, Hwang JJ, et al. Change in centromeric and acentromeric micronucleus frequencies in human populations after chronic radiation exposure. *Mutagenesis*. 1999;14:427–32.
- Chazel V, Houpert P, Ansoborlo E, Henge-Napoli MH, Paquet F. Variation of solubility, biokinetics and dose coefficient of industrial uranium oxides according to specific surface area. *Radiat Prot Dosimetry*. 2000;88:223–31.
- Chiu BC, Dave BJ, Blair A, Gapstur SM, Zahm SH, Weisenburger DD. Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;108: 1363–9.
- Chiu BC, Lan Q, Dave BJ, Blair A, Zahm SH, Weisenburger DD. The utility of t(14;18) in understanding risk factors for non-Hodgkin lymphoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008;39:69–73.
- Chung HJ, Levens D. C-myc expression: keep the noise down! *Mol Cells*. 2005;20:157–66.
- Costa Raiol LC, Figueira Silva EC, Mendes da Fonseca D, Leal MF, Guimarães AC, Calcagno DQ, et al. Interrelationship between MYC gene numerical aberrations and protein expression in individuals from northern Brazil with early gastric adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;181: 31–5.
- Dias FL, Antunes LMG, Rezende PA, Carvalho FES, Silva CMD, Matheus JM, et al. Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007;23:228–33.
- Dorsey CD, Engelhardt SM, Squibb KS, McDiarmid MA. Biological monitoring for depleted uranium exposure in U.S. Veterans. *Environ Health Perspect*. 2009;117:953–6.
- El-Dine NW, Sroor A, el-Shershaby A, el-Bahi SM, Ahmed F. Radioactivity in local and imported kaolin types used in Egypt. *Appl Radiat Isot*. 2004;60:105–9.
- Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect*. 1993;3:101–7.

- Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985;147:29–36.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The human micronucleus project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1997;428:271–83.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003;534:65–75.
- GAO (United States General Accounting Office). Gulf War illness. Understanding of health effects from DU evolving but safety training needed GAO/NSIAD-00-70. 2000.
- Gourabi H, Mozdarani H. A cytokinesis-blocked micronucleus study of the radioadaptive response of lymphocytes of individuals occupationally exposed to chronic doses of radiation. *Mutagenesis.* 1998;13:475–80.
- Guimarães AC, Quintana LG, Leal MF, Takeno SS, Assumpção PP, Lima EM, et al. Aneuploidy of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridisation in ACP01 cell line gastric adenocarcinoma. *Clin Exp Med.* 2006;6:129–33.
- Hindin R, Brugge D, Panikkar B. Teratogenicity of depleted uranium aerosols: a review from an epidemiological perspective. *Environ Health.* 2005;4:17.
- Hopman AH, Ramaekers FC, Raap AK, Beck JL, Devilee P, Van Der Ploeg M, et al. In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry.* 1988;89:307–16.
- Ibrulj S, Krunić-Haverić A, Haverić S, Pojskić N, Hadziselimović R. Micronuclei occurrence in population exposed to depleted uranium and control human group in correlation with sex, age and smoking habit. *Med Arh.* 2004;58:335–8.
- Ibrulj S, Haverić S, Haverić A. Chromosome aberrations as bioindicators of environmental genotoxicity. *Bosn J Basic Med Sci.* 2007;7:311–6.
- International Atomic Energy Agency, IAEA. Chromosomal aberration analysis for dose assessment. In: *Biological dosimetry. Technical reports series no. 260.* IAEA, Vienna, Austria. 1986.
- International Commission on Radiological Protection – ICRP. Protection against radon-222 at home and at work. *Ann ICRP.* 1993;65:23.
- Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;36:211–23.
- Jiang F, Lin F, Price R, Gu J, Medeiros LJ, Zhang HZ, et al. Rapid detection of IgH/BCL2 rearrangement in follicular lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization with bacterial artificial chromosome probes. *J Mol Diagn.* 2002;4:144–9.
- Joseph LJ, Patwardhan UM, Samuel AB. Frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res.* 2004;564:83–8.
- Kapka L, Baumgartner A, Siwińska E, Knudsen LE, Anderson D, Mielżyńska D. Environmental lead exposure increases micronuclei in children. *Mutagenesis.* 2007;22:201–7.
- Kathren RL. Radioactivity in the environment: sources, distribution and surveillance. New York: Harwood Academic; 1984. p. 397.
- Kathren RL. NORM sources and their origins. *Appl Radiat Isot.* 1998;49:149–68.
- Ketelslegers HB, Gottschalk RW, Koppen G, Schoeters G, Baeyens WF, van Larebeke NA, et al. Multiplex genotyping as a biomarker for susceptibility to carcinogenic exposure in the FLEHS biomonitoring study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:1902–12.
- Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999;59:1693–700.
- Krunić A, Haverić S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2005;56:227–32.
- Kryscio A, Ulrich Müller WU, Wojcik A, Kotschy N, Grobelny S, Streffer C. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int J Radiat Biol.* 2001;77:1087–93.
- Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, Salonen L, Karpas Z, Komulainen H, et al. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am J Kidney Dis.* 2006;47:972–82.
- Lin RH, Wu LJ, Lee CH, Lin-Shiau SY. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 1993;319:197–203.
- Lipsztein JL, da Cunha KM, Azeredo AM, Julião L, Santos M, Melo DR, et al. Exposure of workers in mineral processing industries in Brazil. *J Environ Radioactivity.* 2001;54:189–99.
- Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:8910–14.
- McDiarmid MA, Engelhardt S, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, et al. Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A.* 2004;67:277–96.
- McHale CM, Lan Q, Corso C, Li G, Zhang L, Vermeulen R, et al. Chromosome translocations in workers exposed to benzene. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008;39:74–7.
- Meijerink JP. t(14;18), a journey to eternity. *Leukemia.* 1997;11:2175–87.
- Melo VP. Avaliação da concentração do <sup>222</sup>Rn nos ambientes internos e externos em residências do município de Monte Alegre, PA. Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; 1999.
- Mészáros G, Bognár G, Köteles GJ. Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners. *J Occup Health.* 2004;46:310–5.
- Meyer N, Kim SS, Penn LZ. The Oscar-Worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 2006;16:275–87.
- Milaci S, Petrovi D, Jovici D, Kovacevi R, Simi J. Examination of the health status of populations from depleted-uranium-contaminated regions. *Environ Res.* 2004;95:2–10.
- Miller AC, Blakely WF, Livengood D, Whittaker T, Xu J, Ejenk JW, et al. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium–uranyl chloride. *Environ Health Perspect.* 1998;106:465–71.
- Miller AC, Xu J, Mog S, McKinney L, Page N. Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles: induction of genotoxic effects. *Carcinogenesis.* 2001a;22:115–26.

- Miller AC, Xu J, Stewart M, McClain D. Suppression of depleted uranium-induced neoplastic transformation of human cells by the phenyl fatty acid, phenyl acetate: chemoprevention by targeting the P21ras protein pathway. *Radiat Res.* 2001b;155:163–70.
- Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem.* 2002;91:246–52.
- Miller AC, Brooks K, Stewart M, Anderson B, Shi L, McClain D, et al. Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact.* 2003;64:247–59.
- Miller AC, Beltran D, Rivas R, Stewart M, Merlot RJ, Lison PB. Radiation- and depleted uranium-induced carcinogenesis studies: characterization of the carcinogenic process and development of medical countermeasures. NATO RTG-099. 2005.
- Mirto H, Barrouillet MP, Henge-Napoli MH, Ansoborlo E, Fournier M, Cambar J. Influence of uranium (VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells. *Hum Exp Toxicol.* 1999;18:180–7.
- Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1005–15.
- Monleau M, De Méo M, Paquet F, Chazel V, Dumenil G, Donnadiou-Claraz M. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci.* 2006;89:287–95.
- Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006;600:37–45.
- NRC (National Research Council). Health effects of exposure to radon: BEIR VI. Washington, DC: National Academy Press; 1999.
- NRC (National Research Council). Review of the toxicologic and radiologic risks to military personnel from exposures to depleted uranium during and after combat. Washington, DC: The National Academies Press; 2008.
- Oestreicher U, Braselmann H, Stephan G. Cytogenetic analyses in peripheral lymphocytes of persons living in houses with increased levels of indoor radon concentrations. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104:232–6.
- Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol.* 1999;75:395–405.
- Pereira ER, Zenquer AO, Chamon N. Projeto Monte Alegre - Avaliação de indícios. Rio de Janeiro: Empresas Nucleares Brasileiras; 1983.
- Pinke D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:2934–8.
- Prat O, Berenguer F, Malard V, Tavan E, Sage N, Steinmetz G, et al. Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics.* 2005;5:297–306.
- Preston RJ, San Sebastian JR, McFee AF. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat Res.* 1987;189:175–83.
- Scannell CH, Balmes JR. Pulmonary effects of firefighting. *Occup Med.* 1995;10:789–801.
- Seiler RL. Temporal changes in water quality at a childhood leukemia cluster. *Ground Water.* 2004;42:446–55.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Scheider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;75:184–91.
- Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Meth Mol Biol.* 1999;113:203–12.
- Stearns DM, Yazzie M, Bradley AS, Coryell VH, Shelley JT, Ashby A, et al. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis.* 2005;20:417–23.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Marcos R. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res.* 1995;342:43–59.
- Taulan M, Paquet F, Maubert C, Delissen O, Demaille J, Romey MC. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect.* 2004;112:1628–35.
- Thiébaud C, Carrière M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52<sup>E</sup>) proximal cells. *Toxicol Sci.* 2007;98:479–87.
- Thierens H, Vral A, Morthier R, Aousalah B, De Ridder L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis.* 2000;15:245–9.
- Tice RR, Strauss GH. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells.* 1995;13:207–14.
- Tsai MH, Hwang JS, Chen KC, Lin YP, Hsieh WA, Chang WP. Dynamics of changes in micronucleus frequencies in subjects post cessation of chronic low-dose radiation exposure. *Mutagenesis.* 2001;16:251–5.
- UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation). Report to the General Assembly Sources and effects of ionizing radiation. New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, United Nations; 1977.
- UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation). Ionizing radiation: sources and biological effects. New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, United Nations; 1982.
- UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation). 2006 report to the General Assembly, with scientific annexes A and B Effects of ionizing radiation, vol. 1. Vienna: United Nations; 2008.
- Urnovitz HB, Tuite JJ, Higashida JM, Murphy WH. RNAs in sera of Persian Gulf War veterans have segments homologous to chromosome 22q11.2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:330–3.
- Department of Veterans Affairs, Veterans Health Administration, and Department of Defense, Office of the Assistant Secretary of Defense, Health Affairs. Combined Analysis of the VA and DoD Gulf War Clinical Evaluation Programs: a study of the clinical findings from systematic medical examinations of 100,339 US Gulf War Veterans, 1999. September 2002.

- Vral A, Thierens H, De Ridder L. In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 1997;71:61–8.
- Wan B, Fleming JT, Schultz TW, Sayler GS. In vitro immune toxicity of depleted uranium: effects on murine macrophages, CD4<sup>+</sup> T cells, and gene expression profiles. *Environ Health Perspect.* 2006;114:85–91.
- Wolf G, Arndt D, Kotschy-Lang N, Obe G. Chromosomal aberrations in uranium and coal miners. *Int J Radiat Biol.* 2004;80:147–53.
- Yazzie M, Gamble SL, Civitello ER, Stearns DM. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem Res Toxicol.* 2003;16:524–30.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)