



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E  
NUCLEARES

**LAÍS MELO DA SILVA**

**ANÁLISE DE DANOS CITOGENÉTICOS EM LINFÓCITOS HUMANOS  
EXPOSTOS AO RADÔNIO-222**

Recife

2022

**LAÍS MELO DA SILVA**

**ANÁLISE DE DANOS CITOGENÉTICOS EM LINFÓCITOS HUMANOS  
EXPOSTOS AO RADÔNIO-222**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio-Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Coorientador: Prof. Dr. Fabiana Farias de Lima.

Recife

2022

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

S586a Silva, Laís Melo da.  
Análise de danos citogenéticos em linfócitos humanos expostos ao Radônio-222 / Laís Melo da Silva. - 2022. 65 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Farias de Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2022.

Inclui Referências e Anexos.

1. Energia Nuclear. 2. Biomonitoramento humano. 3. Linfócitos. 4. Radônio-222. I. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque (Orientadora). II. Lima, Fabiana Farias de (Coorientadora). III. Título.

UFPE

621.4837CDD (22. ed.)

BCTG/2022-145

**LAÍS MELO DA SILVA**

**ANÁLISE DE DANOS CITOGENÉTICOS EM LINFÓCITOS HUMANOS  
EXPOSTOS AO RADÔNIO-222**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio-Ambiente.

Aprovada em: 15/02/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Dra. Mariana Esposito Mendes  
Centro Universitário Brasileiro  
(UNIBRA)

---

Dra. Maíra de Vasconcelos Lima  
Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE)

Dedicado com amor aos meus pais, Marenice e César.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são primeiramente direcionados ao meu Deus, sem Ele não teria chegado até o fim desse projeto.

Agradeço também a toda minha família, que tem sido minha rede de apoio esses anos, não me deixando desistir e tornando o caminho mais leve de trilhar. Mainha, Painho, Vovó Dora, vocês são o motivo de eu insistir em dar sempre meu melhor e lhes dá orgulho, amo vocês, obrigada pelos colos, pelas orações e palavras de incentivo.

Meu esposo amado, Tiago, não tenho palavras para te agradecer tudo que você fez por mim nesse mestrado. Obrigada pelo amor, apoio e por ser meu porto seguro. Te amo.

Amigos do Laboratório de Dosimetria Biológica, sem vocês mais da metade desse trabalho não teria sido realizado. Muito obrigada por toda ajuda e suporte, tive sempre alguém ao meu lado colocando a mão na massa comigo, ouvindo música, podcasts e jogando conversa fora enquanto isso (risos). Alessa, um agradecimento especial a você que esteve comigo desde o início até nos fins de semana quando necessário. Gael, Fernanda, Júlio, Akíria e Mari, vocês também foram fundamentais nesse processo, obrigada.

Aos componentes do Laboratório de Radiobiologia, principalmente Dewson, Vinícius e Williams, meus agradecimentos pelo suporte com o ensaio cometa, vocês também foram fundamentais para que essa parte do projeto fosse realizada com maestria.

Aqueles que contribuíram de alguma forma, meus agradecimentos também são reservados a vocês: Renata, Elvis, Mariana, Emerson e outros que mesmo sem eu saber ajudaram bastante. Às minhas queridas orientadoras, Ana e Fabiana, eu agradeço de coração. Por todo o suporte nesses quase três anos de mestrado atípico em meio a uma pandemia global. Diante desse cenário ou até mesmo de um cenário “normal” tenho certeza de que não poderia pedir orientadoras melhores, obrigada mesmo Ana e Fabi.

Por fim, agradeço ao PROTEN pelo conhecimento adquirido (e título que espero adquirir) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A exposição dos seres humanos a radionuclídeos que ocorrem naturalmente no meio ambiente e como estes interagem e são incorporados no organismo é uma das preocupações da Radioecologia. Essa exposição varia em graus dependendo da localização da fonte de exposição, presente em diversas partes do ecossistema, e do cotidiano do indivíduo exposto. Estudos realizados em municípios da região metropolitana do Recife verificaram a presença de radionuclídeos como o radônio na atmosfera, no solo e nas águas nesses locais. No entanto, ainda existe a necessidade da realização de um estudo de biomonitoramento humano na população residente dessa região. Para que esse estudo ocorra é necessário verificar a adequação de técnicas biodosimétricas, que se propõe a avaliar a frequência de danos causados por radiações ionizantes ao organismo, mensurando, quando possível, o nível de exposição a que foram submetidos. Neste trabalho foram avaliadas três técnicas biodosimétricas, sendo elas: Técnica do Cromossomo Dicêntrico, Técnica de Micronúcleo e Ensaio Cometa. O trabalho propôs a exposição *in vitro* de amostras de sangue humano periférico ao gás Rn222 em quatro diferentes concentrações, sendo elas 93,3; 66,1; 26,0 e 19,4 KBq/m<sup>3</sup>, e ainda um grupo de amostras controle não-expostas. As amostras foram processadas e os linfócitos obtidos foram avaliados para cada uma das técnicas, a saber metáfases para a técnica de dicêntrico, células binucleadas para a técnica de micronúcleo e células mononucleadas individuais para o ensaio cometa. Os resultados demonstraram a sensibilidade do ensaio de dicêntrico, corroborando-o como padrão ouro da biodosimétricas. Evidenciaram o ensaio cometa como técnica promissora para a classificação entre a presença ou ausência de exposição. Entretanto, a técnica de micronúcleo não se mostrou satisfatória, pois a frequência de micronúcleos permaneceu à esperada para amostras não expostas. Desse modo, das três técnicas avaliadas, a técnica de dicêntrico e o ensaio cometa se mostraram adequados a evidenciar a exposição à radiação, diferenciando amostras expostas e não expostas, sendo a técnica de dicêntrico animadora para a avaliação do nível de exposição, podendo ser utilizada como base para estudos futuros, *in vitro* e de biomonitoramento.

Palavras-chave: biomonitoramento humano; linfócitos; Radônio-222.

## ABSTRACT

The exposure of human beings to radionuclides that occur naturally in the environment and how they interact and are incorporated into the body is one of the concerns of Radioecology. This exposure varies in degrees depending on the location of the exposure source, present in different parts of the ecosystem, and the daily life of the exposed individual. Studies carried out in municipalities in the metropolitan region of Recife verified the presence of radionuclides such as radon in the atmosphere, soil and waters in these places. However, there is still a need to carry out a study of human biomonitoring in the population residing in this region. For this study to take place, it is necessary to verify the adequacy of biodosimetric techniques, which aim to assess the frequency of damage caused by ionizing radiation to the body, measuring, when possible, its exposure level. In this work, three biodosimetric techniques were evaluated, namely: Dicentric Chromosome Technique, Micronucleus Technique and Comet Assay. The work proposed the in vitro exposure of human peripheral blood samples to Rn222 gas at four different concentrations, being 93.3; 66.1; 26.0 and 19.4KBq/m<sup>3</sup>, plus an unexposed control sample. The samples were processed, and the lymphocytes obtained were evaluated for each technique, namely metaphases for the dicentric technique, binucleate cells for the micronucleus technique and individual mononuclear cells for the comet assay. The results demonstrated the sensitivity of the dicentric assay, confirming it as the gold standard of biodosimetrics. They showed the comet assay as a promising technique for classifying the presence or absence of exposure. However, the micronucleus technique was not satisfactory, as the frequency of micronuclei remained as expected for unexposed samples. Thus, of the three techniques evaluated, the dicentric technique and the comet assay proved to be adequate to evidence exposure to radiation, differentiating exposed and unexposed samples, with the dicentric technique being encouraging for the assessment of the level of exposure, which can be used as a basis for future in vitro and biomonitoring studies.

Keywords: human biomonitoring; lymphocytes; Radon-222.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de radiação ionizante e seu respectivo poder de penetração .....	14
Figura 2 – Conceito ilustrado de LET .....	15
Figura 3 – Dose individual média anual decorrente de fontes naturais .....	16
Figura 4 – Série de decaimento natural do $^{238}\text{U}$ destacando os radionuclídeos $^{226}\text{Ra}$ e $^{222}\text{Rn}$ e suas emissões alfa em vermelho. ....	18
Figura 5 – Entrada do gás radônio nas construções. ....	20
Figura 6 – Fotografia de célula metafásica com alterações cromossômicas instáveis .....	26
Figura 7 – Células binucleadas sem e com micronúcleo .....	27
Figura 8 – Grau de danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa em linfócitos humanos .....	29
Figura 9 – Setup de Exposição das amostras na Câmara de calibração RN1-CRCN.....	31
Figura 10 – Fonte de $\text{Ra}^{226}$ PYLON RN-1025-100, Pylon Eletronics.....	31
Figura 11 – Fotografias de células metafásicas com alterações cromossômicas.....	34
Figura 12 – Fotografia de células binucleadas com dois micronúcleos e com três micronúcleo.....	35
Figura 13 – Células observadas em ordem crescente de dano.....	42
Figura 14 – Gráfico de Score de Danos por amostra .....	44
Figura 15 – Índice de danos no DNA em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de $\text{Rn}^{222}$ e não expostos.....	45
Figura 16 – Integridade do DNA do sangue total na população que habita os locais de referência contaminado.....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre contagem absoluta de linfócitos e a dose absorvida após a exposição. ....	23
Tabela 2 – Distribuições intercelulares de dicêntricos e de fragmentos isolados.....	38
Tabela 3 – Análise da Frequência de dicêntricos e Distribuição de Poisson.....	40
Tabela 4 – Distribuições intercelulares micronúcleos .....	41
Tabela 5 – Distribuições de danos entre as amostras com seus respectivos Índice de Danos (DI) e Frequência de Danos (DF) .....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>14</b>
2.1	<b>Radioatividade</b>	<b>14</b>
2.1.1	Radiações de alta Transferência Linear de Energia	15
2.1.2	Radioatividade Natural	16
2.1.3	Radionuclídeos de ocorrência natural - NORMs	17
2.1.4	Regiões com alto <i>background</i> radioativo natural	18
2.2	<b>Radônio</b>	<b>19</b>
2.2.1	Efeitos do Radônio na saúde humana	21
2.2.2	Efeitos genéticos do Radônio	21
2.3	<b>Biomonitoramento humano</b>	<b>22</b>
2.3.1	Efeito biológico da radiação	22
2.3.2	Radiossensibilidade e linfócitos	23
2.3.3	Biomarcadores	24
2.4	<b>Ensaio citogenéticos</b>	<b>25</b>
2.4.1	Ensaio de Dicêntrico	25
2.4.2	Ensaio de Micronúcleo	27
2.4.3	Ensaio Cometa	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
3.1	<b>Seleção do doador e coleta das amostras</b>	<b>30</b>
3.2	<b>Exposições das amostras ao Rn<sup>222</sup></b>	<b>30</b>
3.3	<b>Ensaio citogenético das alterações cromossômicas (cromossomos dicêntricos) em linfócitos humanos</b>	<b>32</b>

3.3.1	Cultivo de Células .....	32
3.3.2	Preparação das lâminas.....	33
3.3.3	Análise Microscópica .....	33
3.4	<b>Ensaio de Micronúcleo por bloqueio de citocinese .....</b>	<b>34</b>
3.4.1	Cultivo de Células .....	34
3.4.2	Preparação das lâminas.....	34
3.4.3	Análise Microscópica .....	35
3.4.4	Análise Estatística.....	36
3.5	<b>Ensaio Cometa .....</b>	<b>36</b>
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1	<b>Ensaio citogenético das alterações cromossômicas (cromossomos dicêntricos) em linfócitos humanos .....</b>	<b>38</b>
4.2	<b>Ensaio de Micronúcleo por bloqueio de citocinese .....</b>	<b>40</b>
4.3	<b>Ensaio Cometa .....</b>	<b>42</b>
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
6	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXO C.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os seres vivos sempre estiveram expostos às radiações ionizantes provenientes de materiais naturalmente radioativos, também intitulados de Material Radioativo de Ocorrência Natural (NORM). Esta exposição varia em graus dependendo das atividades diárias e da localização frente as fontes radioativas naturais, presentes em diferentes compartimentos do ecossistema como solo, ar, água, alimentos e o próprio corpo humano (KAMAIEV, 2016; KIM, 2016). Surge, então, a Radioecologia, buscando identificar e compreender as essas fontes de radiação e o transporte e efeitos dos radionuclídeos no ambiente a curto e a longo prazo. Outra preocupação desta área de estudo é a incorporação de radionuclídeos por inalação ou ingestão, bem como modelagem de circunstâncias que possam descrever efeitos para os seres humanos como consequência dessas exposições (MARGERIT et al, 2015; SANTOS JUNIOR et al, 2017).

Estudos radiométricos realizados pelo grupo de Radioecologia do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (RAE-DEN-UFPE) e o Serviço de Monitoração Ambiental (SEAMB) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) verificaram a presença de radionuclídeos como radônio, rádio, urânio e tório em alimentos, na atmosfera, água de poços e no solo na região metropolitana do Recife, abrangendo os municípios de Paulista, Abreu e Lima e Olinda (AMARAL et al., 2005; MORENO DE SOUZA, 2006; MORAIS, 2013; DO AMARAL et al., 2019). No entanto, ainda não foi realizado nenhum estudo da influência destes radionuclídeos sobre a população que reside nestes locais. A presença do radônio merece ser ressaltada por ser um gás que pode ser inalado, depositando os produtos de seu decaimento no trato respiratório. Vale salientar que estes têm meia vida curta e emitem partículas carregadas e radiação gama no organismo (DUGGAL, 2018; MAZZILLI et al, 2011). Para a realização da biomonitoração humana da população exposta naturalmente ao radônio, se faz necessário adequar e padronizar as técnicas biodosimétricas, um dos motivos que impulsionou a realização deste estudo. Atualmente existe uma grande preocupação com os possíveis efeitos biológicos da exposição à radiação ambiental, cujo *background* está acima do recomendado pela UNSCEAR (*United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation*) e principalmente os riscos associados ao surgimento de diferentes neoplasias no homem (SCHUBAUER-BERIGAN, 2009; SPACOV, 2018). Diante destes fatos, a biomonitoração humana (BHM) tem sido utilizada na avaliação de efeitos no organismo vivo expostos a agentes químicos e físicos. As técnicas utilizadas na BHM analisam os níveis dos metabólitos, danos ao DNA e produtos de reações

químicas nos fluidos biológicos como: sangue, urina, leite materno, saliva, cabelo e unha. O tecido sanguíneo é o mais utilizado, pois está em contato constante com todo o organismo, ou seja, presente nos órgãos e demais tecidos (SILVA, 2018) e a célula utilizada é o linfócito, dada sua radiosensibilidade e facilidade de obtenção (IAEA, 2011). Portanto, a BHM é indispensável para estimar riscos à saúde humana, além de analisar efeitos biológicos e mensurar absorção de substâncias no organismo, fornecendo resultados que complementam o estudo da monitoração das matrizes ambientais como a água, atmosfera e solo (ANGERER et al., 2007).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo geral avaliar a adequação de diferentes técnicas de biomonitoração humana a serem aplicadas em regiões de ocorrência NORM com comprovada existência do gás radônio ( $Rn^{222}$ ), visando especificamente:

- Analisar *in vitro* a produção de danos citogenéticos do sangue humano exposto ao  $Rn^{222}$  por meio da análise da frequência de cromossomos dicêntricos em metáfases e de micronúcleos em células binucleadas.
- Verificar o índice de danos no DNA de células mononucleadas do sangue periférico exposta ao radônio por meio do ensaio cometa.
- Estabelecer o grau de adequação de cada técnica realizada em avaliar os danos biológicos ao DNA dos linfócitos expostos ao  $Rn^{222}$ .

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Radioatividade

O núcleo dos elementos radioativos passa por diversas transformações com a finalidade de atingir estabilidade, a cada transformação o isótopo pode emitir partículas, como alfa ou beta por exemplo, e ainda ondas de energia eletromagnética, os raios gama (Figura 1) (OKUNO, 2013).

Figura 1 – Tipos de radiação ionizante e seu respectivo poder de penetração



Fonte: United States Environmental Protection Agency | US EPA, 2018 (Adaptado).

As partículas  $\alpha$  (alfa) são relativamente pesadas, são emitidas de núcleos de número atômico maior que 82 e, devido à sua massa, equivalente a um núcleo de  $\text{He}^+$ , não possui grande poder de penetração na matéria, no entanto representa risco ao organismo vivo, caso haja contaminação interna (BOFF et al, 2017; CHRISTENSEN, 2014a).

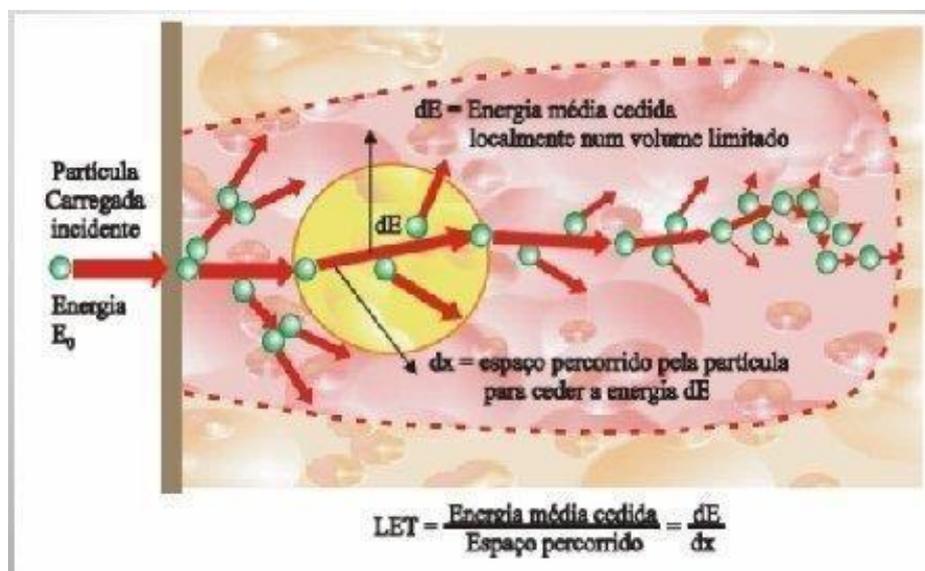
As partículas  $\beta$  (beta) podem ser carregadas negativa ou positivamente, todavia ambas são equivalentes a um elétron em relação a massa, bem menores e leves que partículas alfa, por isso, mais penetrantes, apresentando risco interno e externo à matéria viva (OKUNO, 2013; CHRISTENSEN, 2014a). Após a emissão de radiações particuladas, alguns núclídeos

continuam em estado excitado e liberam energia em forma de raios gama. Estas ondas eletromagnéticas são pura energia e não possuem carga ou massa, sendo o tipo mais penetrante das emissões radioativas citadas. A radiação gama deposita sua energia por meio de fótons liberados a cada interação em sua trajetória (OKUNO, 2013; CHRISTENSEN, 2014a).

### 2.1.1 Radiações de alta Transferência Linear de Energia

A densidade dos eventos de ionização provocados por uma radiação em determinado meio material é entendida como Transferência Linear de Energia (do inglês, *Linear Energy Transfer* - LET) (NIEMANTSVERDRIET et al, 2012) (Figura 2). Radiações podem ser definidas como de alta ou baixa LET, da maneira que segue: uma a perda média de energia em uma trajetória curta caracteriza uma radiação de alta LET, sendo elas partículas alfa, nêutrons, íons pesados e fragmentos de fissão; já o inverso, menor perda de energia média em uma trajetória mais longa caracteriza uma radiação de Baixa LET, sendo elas, representadas pelas partículas beta, os raios X e gama, devido a produção secundária de elétrons (IAEA, 2011; WEISSLEDER, 2011).

Figura 2 – Conceito ilustrado de LET



Fonte: IAEA, 2011 (adaptado).

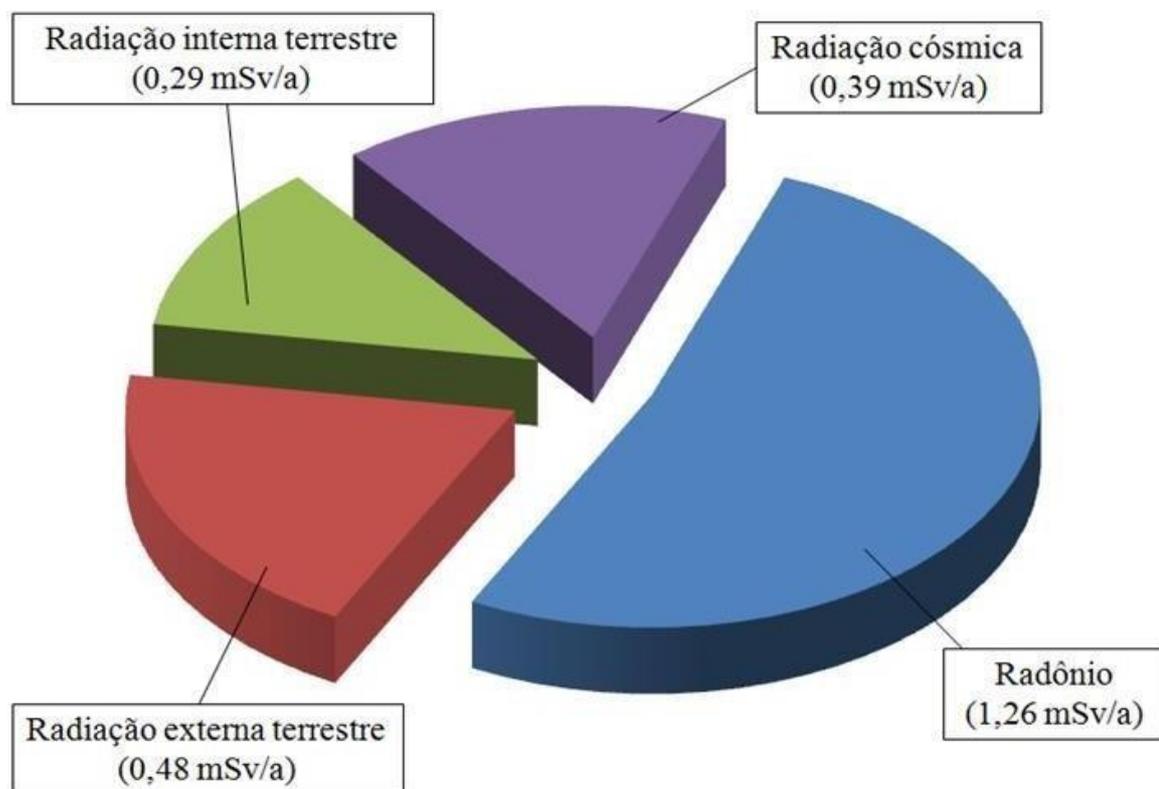
Radiações de alta LET acabam por produzir uma trilha densa de eventos de ionização e excitação devido a sua forma de deposição de energia que levam a formação de danos complexos ao DNA, sendo observados uma maior citotoxicidade, mutagênese e instabilidade genômica, culminando em efeitos deletérios menos fáceis de serem reparados (CARTER, 2017; POUGET, 2002). Um agravante a esses danos é a ocorrência dos mesmos em clusters no DNA,

contribuindo para o aumento da letalidade (HADA, 2008). As chances desses danos serem iguais ou aumentarem com a exposição fracionada ou crônica à radiação de alta LET é um fenômeno conhecido como "efeito reverso da taxa de dose" e pode ser prejudicial à saúde de indivíduos expostos constantemente a doses mais elevadas que o natural (GRIDLEY, 2002).

### 2.1.2 Radioatividade Natural

A maior parte da radiação recebida pela população mundial provém de fontes naturais, que vêm atingindo a superfície da Terra ao longo do tempo. A chamada radioatividade ambiental é advinda da exposição aos raios cósmicos, radionuclídeos cosmogênicos, aplicações antrópicas das radiações ionizantes e principalmente, de elementos radioativos naturais. Observa-se na figura 3 que o radônio e seus descendentes apresentam maior contribuição nesta exposição, com uma dose efetiva média anual de 1,26 mSv/ano, seguida pela radiação externa terrestre (0,48 mSv/ano), radiação cósmica (0,39 mSv/ano) e radiação interna terrestre (0,29 mSv/ano) (UNSCEAR, 2008; JOHNSON et al., 2015).

Figura 3 - Dose individual média anual decorrente de fontes naturais



Fonte: UNSCEAR, 2008.

Os principais radionuclídeos naturais presentes na crosta terrestre desde sua origem são representados pelo urânio, tório e potássio, elementos de meia vida longa, do ponto de vista da exposição humana. Podem ser encontrados no ar, na água, no solo, nas rochas, nos vegetais e alimentos e que contribuem com cerca 83% da dose média anual. Dessa porcentagem 13% decorrem do  $^{40}\text{K}$ , 53% do  $^{222}\text{Rn}$  e seus descendentes, e 17% correspondem aos outros radionuclídeos das séries naturais do  $^{238}\text{U}$  e do  $^{232}\text{Th}$  (UNSCEAR, 2000).

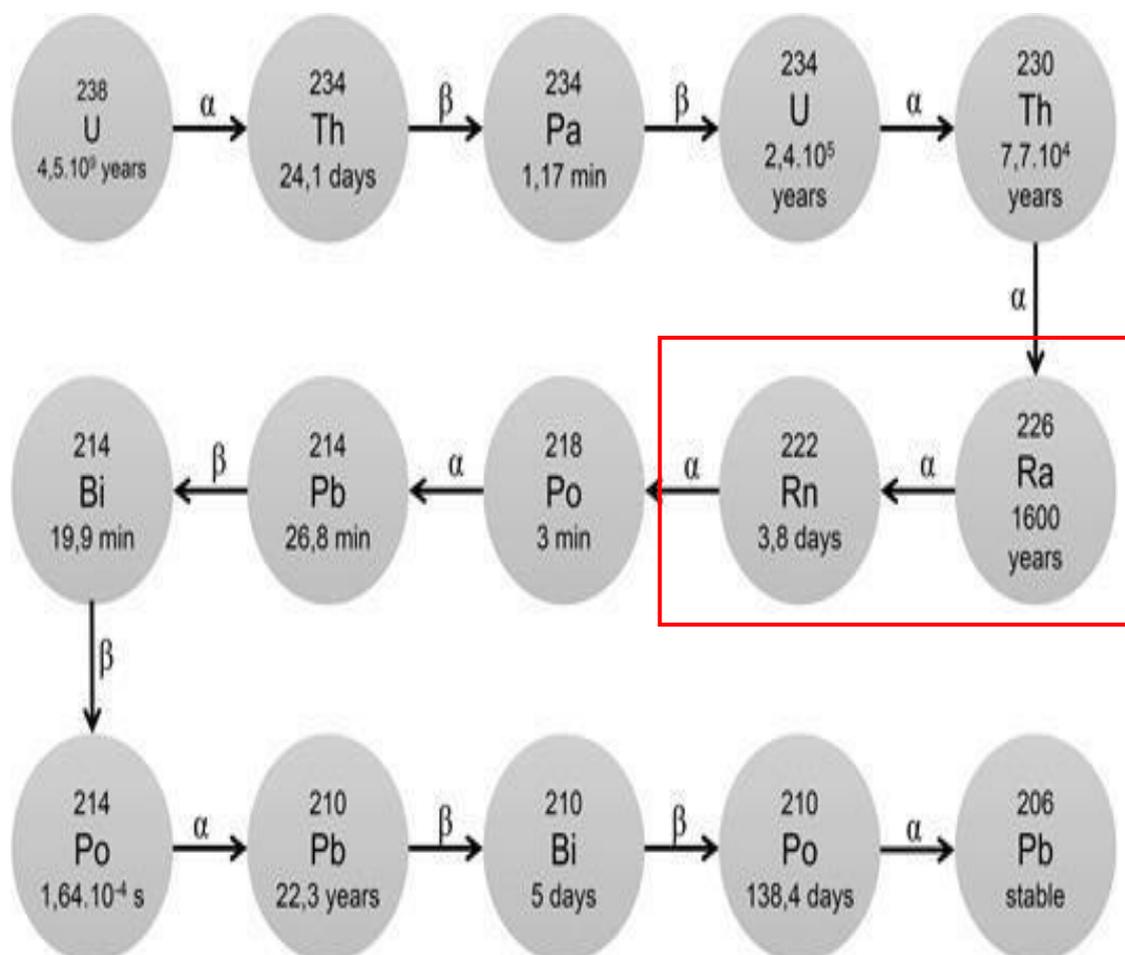
### 2.1.3 Radionuclídeos de ocorrência natural – NORMs

Os radionuclídeos de ocorrência natural, abreviados pelo acrônimo NORMs (do inglês, *Naturally Occurring Radioactive Materials*), são encontrados principalmente em formações geológicas como em rochas, solo, água, ar e sedimentos. Esses elementos estão instáveis e por meio de transformações buscam um estado de equilíbrio. A sucessão destas transformações caracteriza a série de decaimento deste material, sendo única para cada radioisótopo e onde a taxa com que elas acontecem é a atividade deste radionuclídeo.

Na série radioativa do  $^{238}\text{U}$ , destaca-se o  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{222}\text{Rn}$  (Figura 4), emissores de partículas alfa que permanecem em estado excitado sendo necessário a liberação da energia excedente em forma de radiação gama (MAZZILLI et al, 2011; ISINKAYE, 2015; KRISHNASWAMI, 2016). A exposição a estes radionuclídeos pode ocorrer de forma externa ao ar livre ou dentro de construções, principalmente àquelas de alvenaria ou, ainda de forma interna por meio da inalação ou ingestão, resultando ambas as exposições em uma irradiação de corpo inteiro (HOSODA et al, 2020).

Os níveis de deposição no ambiente, no entanto, podem variar a cada lugar do planeta, bem como estar relacionado com o tipo de solo de determinada região, variando conseqüentemente a dose absorvida por cada indivíduo. Para rochas como o granito há um maior nível de radiação, enquanto rochas sedimentares apresentam tais níveis mais baixos, com exceção para rochas fosfáticas cuja presença de radionuclídeos é relativamente alta. Na maioria das áreas, a dose efetiva média oscila entre 0,3 e 0,6 mSv/ano, no entanto alguns lugares ultrapassam 250 mSv/ano como a região chamada Morro do Ferro no estado de Minas Gerais ou em outros, como a cidade de Guarapari, Espírito Santo, algumas pessoas chegam a receber de 8 a 15mSv/ano (MAZZILLI et al, 2011, UNSCEAR, 2000).

Figura 4 – Série de decaimento natural do  $^{238}\text{U}$  destacando os radionuclídeos  $^{226}\text{Ra}$  e  $^{222}\text{Rn}$  e suas emissões alfa em vermelho



Fonte: DA COSTA DANTAS et al (2020) adaptado.

#### 2.1.4 Regiões com alto *background* radioativo natural

O maior depósito de rocha fosfática do mundo está localizada em países do norte-africanos e se estende pela Jordânia até o nordeste da Arabia Saudita, chegando bem acima de 7000 milhões de toneladas. Outros países que também possuem reservas de fosfato rico em urânio são Estados Unidos, Espanha, Bélgica e Canadá (AL-ESHAikh et al, 2016). Muitos países desenvolvidos procuram tomar medidas para reduzir o nível de exposição humana à radiação ambiental. Em contrapartida, países em desenvolvimento, em sua maioria, estão no início dos seus estudos de monitoramento radiológico, como acontece em Gana, fazendo com que suas populações desconheçam o risco associado ao solo, água e alimentos cultivados nessas áreas (DARKO et al, 2015).

No Brasil, a geologia diversa do país demarca regionalmente áreas de alta concentração de minerais radioativos, comparável aos registros feitos no Irã (SILVA, 2014). No eixo sulsudeste, a cidade de São José do Rio Preto em São Paulo (SP) e Curitiba no estado do Paraná (PR) são áreas bastante estudadas, pois demonstram níveis elevados de radônio em aquíferos de interesse público já que abastecem boa parte da população apresentando certo risco a saúde pública. Regiões anômalas, porém, com níveis mais baixos de radionuclídeos são encontradas no nordeste da Bahia, centro-oeste de Goiás e região dos Lagos do Rio de Janeiro (DA COSTA DANTAS et al, 2020; SANTOS e BONOTTO, 2014; CORRÊA et al, 2015).

O Nordeste brasileiro se destaca como uma região de grandes assentamentos de rochas urano-fosfatadas no país. Na costa do estado de Pernambuco (PE) até a fronteira do estado da Paraíba (PB) com o Rio Grande do Norte (RN) são encontrados depósitos de até 4 metros de profundidade onde os níveis de Urânio ( $U_3O_8$ ) variam de 150 a 200  $\mu\text{g/g}$ , estando entre as ocorrências mais altas do mundo (AMARAL, 2018). Essa extensa faixa de terra recebeu a denominação de Região Urano Fosfática e despertou interesse na exploração do minério no século passado (MORAIS, 2013a). Atualmente o recurso a ser explorado é o hídrico, sendo encontrados sob essa região aquíferos importantes para o abastecimento da Região Metropolitana de Recife (PE) (RODRIGUES, 2014). Estudos nos recursos ambientais dessa região vem sendo conduzidos a fim de minimizar a exposição humana e os riscos à saúde dessa população (MORAIS et al, 2022b; SANTOS JUNIOR et al, 2017; DO AMARAL et al, 2019).

## 2.2 Radônio

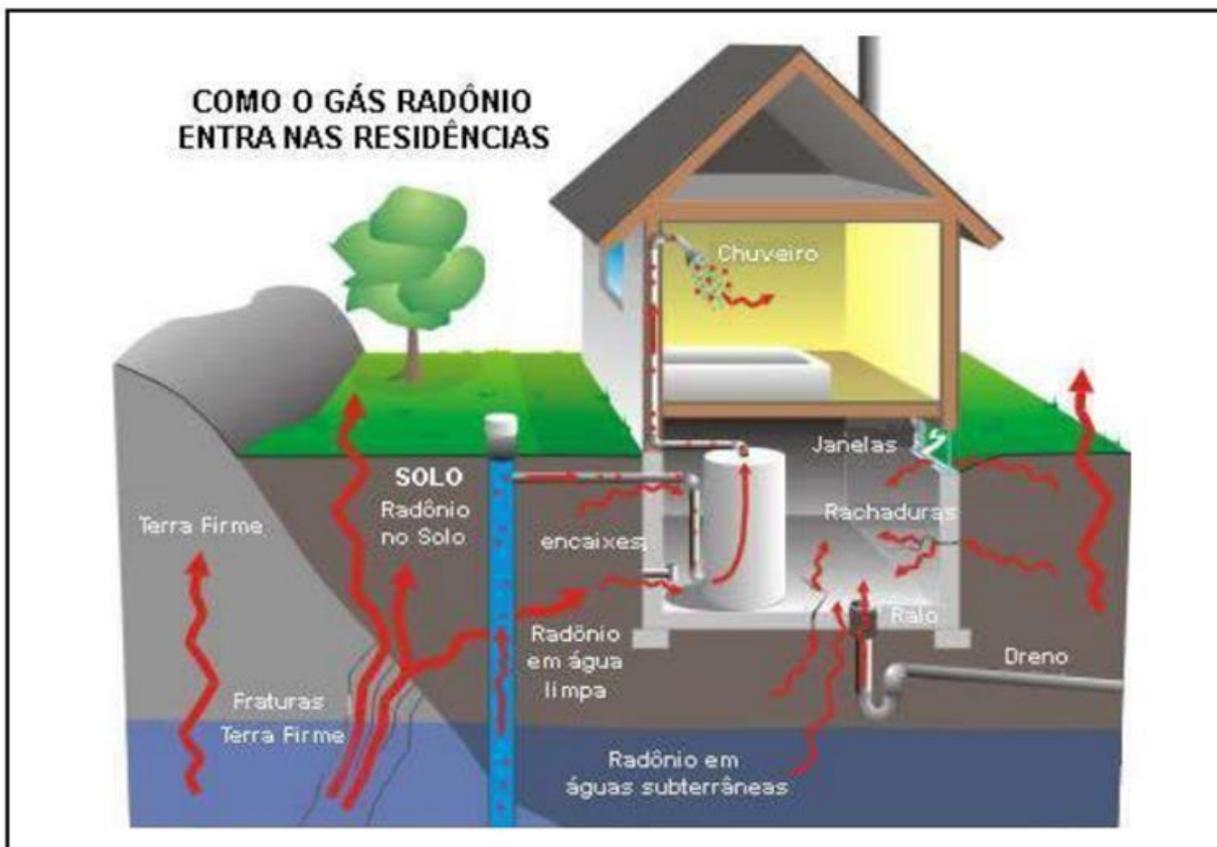
Um pouco mais da metade da radiação natural recebida pelo ser humano é atribuída ao Radônio ( $^{222}\text{Rn}$ ), um gás nobre radioativo produto da série radioativa do  $^{238}\text{U}$ , e potencialmente cancerígeno quando inalado e depositado no pulmão (DUGGAL, 2018).

Além do isótopo advindo do decaimento do  $^{238}\text{U}$ , cujo tempo de meia-vida é de 3.8 dias, o radônio também apresenta cerca de 35 isótopos radioativos cujo números de massa atômica variam entre 195 e 229 (FIELD, 2015). Entre eles, o  $^{220}\text{Rn}$ , conhecido como torônio, produto da família radioativa do  $^{232}\text{Th}$ , com uma meia-vida de 55,6 segundos e, o  $^{219}\text{Rn}$ , elemento da série do  $^{235}\text{U}$ , que detém menor tempo de meia-vida, apenas 3,96 segundos. Destes 35, o  $\text{Rn}^{222}$  tem maior importância e abundância, e, o termo “radônio” pode ser usado de forma genérica para todas as apresentações desse gás nobre. Sendo assim, o Radônio tem características de ser

inerte, inodoro, insípido e sete vezes mais pesado que o ar atmosférico (UNSCEAR, 2000; MAZZILLI et al, 2011; IRD, 2016).

O  $^{226}\text{Ra}$ , encontrado principalmente em granito, em algumas rochas sedimentares e metamórficas, em menor quantidade em basalto e calcário e também no solo de maneira variável, é o ascendente direto do  $^{222}\text{Rn}$  e sua quantidade em minerais presentes nas rochas e no solo, ou ainda dissolvido em fase aquosa irá determinar a concentração do radônio na atmosfera de um determinado ambiente. Outros fatores como a permeabilidade do solo, a porosidade e tamanho dos grãos das rochas, a diferença de pressão entre o ar no solo e o ar atmosférico e a temperatura ambiental, também influenciam nessa concentração. O radônio é produzido continuamente enquanto o rádio decai, podendo ser transportado, alcançando a superfície, através de processos de difusão, advecção, emanação, absorção na fase líquida ou adsorção na fase sólida (UNSCEAR, 2000; PAPP, 2008; PAPP, 2010). Na figura 5 pode-se observar a entrada do gás radônio nas residências.

Figura 5 - Entrada do gás radônio nas construções



Fonte: ENVIRONMENTAL PROTECTION BOARD - EPA US, 2017.

### 2.2.1 Efeitos do Radônio na saúde humana

A maior parte dos estudos epidemiológicos para avaliar os riscos do Radônio à saúde tiveram como população-alvo indivíduos expostos ao gás em ambientes internos, com habitantes de área de alto background radioativo e trabalhadores de minas (AL-ZOUGHLOOL, 2009). Essa escolha se justifica, pois, a concentração desse gás em casas e ambientes fechados tendem a ter concentrações maiores e variáveis que ambientes externos (FIELD, 2015; AL-ZOUGHLOOL, 2009).

A inalação constante do radônio em ambientes internos pode estimular mutações no DNA devido a deposição dos seus produtos de decomposição que possuem uma meia vida de poucos minutos, dentre eles o  $^{218}\text{Po}$ ,  $^{214}\text{Pb}$  e  $^{214}\text{Bi}$ , que emitem partículas alfa, beta e raios gama, no epitélio pulmonar (KIM, 2016; MAZZILLI et al, 2011). Diante disso o Radônio foi declarado carcinogênico em 1988 pela *International Agency for Cancer Research* e considerado a segunda causa de câncer de pulmão depois do tabagismo (KIM, 2016). Essa colocação foi obtida por meio de estudos feitos, principalmente, em mineradores de minas de urânio (HOWE et al., 1986; HOWE et al., 1987; HORNUNG AND MEINHARDT, 1987; SAMET et al., 1991; WOODWARD et al., 1991; KUSIAK et al., 1993; TIRMARCHE et al., 1993; TOMASEK et al., 1994; TOMASEK, 2002; LAURIER et al., 2004; GROSCHE et al., 2006) mas também de outros tipos de minas como ferro (RADFORD AND RENARD, 1984) e de estanho (XUAN et al. 1993), cujo resultados foram usados para projetar o risco em indivíduos expostos residencialmente. Nesses casos 10 a 15% dos óbitos por câncer de pulmão foram atribuídos ao radônio residencial (AL-ZOUGHLOOL, 2009).

Estudos para outras neoplasias também foram conduzidos, partindo do princípio de que outros órgãos também podem receber doses de radiação provenientes do gás radiativo, embora que bem menores, tais como pele e vias respiratórias extratorácicas, e ainda rim e medula óssea (DARBY et al. 1995; RERICHA et al. 2006; SMITH et al, 2007). No entanto, não foram registradas relações claras entre o gás e o surgimento, principalmente, de leucemias e mielomas, porém foi notada que a exposição contínua ao radônio aumentava a chance do agravamento da doença (IRD, 2016; AL-ZOUGHLOOL, 2009).

### 2.2.2 Efeitos genéticos do Radônio

Os mecanismos de indução neoplásica pelo radônio envolvem mutações em genes importantes para proliferação e diferenciação celular, entre eles uma mutação no códon 249 do

gene p53, persistente entre mineiros de urânio que desenvolveram câncer de pulmão (AL-ZOUGHLOOL, 2009). No entanto, danos citogenéticos também são observados em indivíduos expostos ao radionuclídeo, seja de forma laboral ou doméstica, dentre eles as alterações cromossômicas e a formação de micronúcleos.

Estes tipos de danos citogenéticos são úteis na compreensão dos mecanismos moleculares do câncer provocados pelo radônio, que ainda são incertos, e na determinação do risco da exposição contínua a baixas doses de radiação em ambientes residenciais (GHOSH et al. 2007; AL-ZOUGHLOOL, 2009).

Um dos riscos dessa exposição contínua tem relação extrapulmonar. Cerca de 1/3 do que é depositado no pulmão é transportado à corrente sanguínea, o que não deve ser ignorado nesses casos, pois há um aumento comprovado nas taxas de alterações cromossômicas nas células do sangue periférico. (ABO-ELMAGD, 2008). O dano cromossômico observado é relevante mesmo em baixas doses e baixas taxas de dose. Esse crescimento é atribuído a partícula alfa liberada pelo radônio e suas progênes, que tem por característica ser uma radiação de alta LET, transferindo bastante energia no pouco espaço que percorrem, suficiente para causar danos no DNA mesmo em doses mínimas (HAMZA, 2008). A avaliação combinada de marcadores citogenéticos como as alterações cromossômicas, consolidado como um indicador sensível ao dano radioativo e, o micronúcleo fortemente induzido pela radiação, é capaz de estimar precocemente o risco de efeitos tardios, como o câncer (VRAL, 2011; ABO-ELMAGD, 2007).

## **2.3 Biomonitoramento humano**

### **2.3.1 Efeito biológico da radiação**

Ser exposto à radiação ionizante pode trazer consequências a saúde, de forma imediata ou tardia, podendo ser brandas ou bastante graves. A manifestação desses efeitos irá depender de alguns fatores, entre eles: o tipo da radiação e sua respectiva LET; o tipo de exposição, se aguda ou crônica; a dose e a taxa de dose absorvida; e, não menos importante, o tipo de célula ou tecido exposto e a forma em que foi exposto, se parcialmente ou de corpo inteiro (DE MATTOS, 2016).

O efeito biológico propriamente dito devido à radiação ionizante é a culminância de uma cascata de eventos que acontecem em frações de segundos no organismo, sendo iniciada

pelos efeitos físicos, com a deposição da energia da radiação incidente que provoca ionização e quebra de ligações químicas, principalmente na água e no DNA. Estes efeitos são seguidos pelos efeitos químicos, onde os radicais livres formados e liberados na radiólise da água se recombinam e formam novas moléculas como o Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é altamente tóxico às células, e a Hidroxiperila ( $HO_2\cdot$ ) que por sua reatividade, apresenta grande facilidade na destruição das membranas biológicas (FERREIRA et al, 1997). O acúmulo de danos pode provocar apoptose, morte celular programada ou mutações no DNA, evidenciadas através de mudanças nas bases nitrogenadas ou em alterações cromossômicas. Esses episódios são, assim, os efeitos biológicos de fato (LUCHS,2010; DE MATTOS,2016).

### 2.3.2 Radiossensibilidade e linfócitos

A influência do tipo celular na resposta à irradiação tem a ver com a Lei da Radiossensibilidade descrita por Bergonié e Tribondeau em 1906, onde “a radiossensibilidade das células está ligada à sua taxa de proliferação”. Essa afirmação resume o conceito de que células imaturas ou indiferenciadas que tem alto índice mitótico são mais radiossensíveis que células maduras e bem diferenciadas que aparentemente cessaram suas divisões. (VOGIN & FORAY, 2012; FORAY,2012).

Entretanto os agranulócitos, em especial, os linfócitos, atuantes no sistema imunológico, terminais e diferenciados, circulantes no sangue periférico e, portanto, sem divisão ativa, são radiossensíveis. sendo uma exceção a referida lei. Nota-se acentuada linfopenia, depleção na contagem de linfócitos ao hemograma, no indivíduo após algumas horas da exposição à radiação, havendo uma relação direta entre a dose absorvida e o declínio no número destas células (Tabela 1) (DAINIAK, 2002; CHRISTENSEN, 2014b).

Tabela 1 – Relação entre contagem absoluta de linfócitos e a dose absorvida após a exposição

<b>Síndrome da Radiação Aguda (ARS)</b>	<b>Dose Absorvida (Gy)</b>	<b>Contagem de linfócitos (por <math>10^9</math> células por litro)</b>
Suave	1,0 – 2,0	0,7 – 1,5
Moderado	2,0 – 4,0	0,5 – 0,8
Severo	4,0 – 6,0	0,3 – 0,5
Muito Severo	6,0 – 8,0	0,1 – 0,3
Letal	> 8,0	0 – 0,1

Fonte: DAINIAK, 2002.

A característica única dos linfócitos de serem células de fácil obtenção, circulantes por todo o corpo e de boa radiosensibilidade despertou interesse na sua utilização na biodosimetria, a fim de que, através de testes de genotoxicidade e mutagenicidade, exposições de indivíduos à radiação ionizante fossem confirmadas e mensuradas, otimizando o tratamento, quando o mesmo for necessário (IAEA, 2011, GÜERCI et al, 2011).

### 2.3.3 Biomarcadores

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) em 1993, biomarcadores são definidos como “qualquer medição refletindo uma interação entre um sistema biológico e um agente do meio ambiente, que pode ser químico, físico ou biológico”.

A utilização de biomarcadores possibilita mensurar a dose absorvida em indivíduos expostos à radiação ionizante (RI) de forma individualizada, podendo obter informações sobre as necessidades terapêuticas urgentes e prognósticos do indivíduo exposto. O método biológico que faz uso de biomarcadores para estimar a dose absorvida por um indivíduo exposto à RI é denominado biodosimetria e recorrer a este recurso é crítico na ausência da dosimetria física ou na confirmação de dados obtidos por outros métodos dosimétricos (AMARAL, 2008; GRUEL, 2013).

Biomarcadores são úteis também na epidemiologia em situações diversas em que se deseja: 1) estimar ou validar a dose recebida e assim melhorar a correlação entre exposição e resposta biológica; 2) investigar indivíduos ou; 3) detectar precocemente uma doença radioinduzida (PERNOT, 2012). Para tal, as técnicas a serem utilizadas na biodosimetria precisam ter baixo limiar de detecção e baixa variação inter-indivíduos, ser possível estabelecer curvas de calibração dose resposta *in vitro* que retratem as respostas biológicas *in vivo* e certa estabilidade que possibilite a reconstrução da dose em longos períodos após a exposição (MOISEENKO et al., 2016).

Em 1960, Moorhead et al. conduziram um estudo que possibilitou a visualização de cromossomos humanos em linfócitos por meio da estimulação da divisão celular. Esse tipo celular acabou por se tornar um biomarcador ideal uma vez que seu cultivo celular é facilmente conduzido *in vitro*, a confecção de lâminas para avaliação microscópica é simples, sua obtenção é realizada através de uma venopunção e apresenta boa radiosensibilidade apesar de ser uma célula que não está em divisão (IAEA, 2011; MENDES, 2019). Além disso, o dano a nível

genômico observado no linfócito, reflete a média de danos a nível genômico das outras células do organismo (GÜERCI et al, 2011).

## **2.4 Ensaios citogenéticos**

O potencial mutagênico da radiação ionizante, induzindo quebras na fita de DNA, transformações cromossômicas e instabilidade genômica, vem sendo estudado e tais danos citogenéticos correlacionados com a dose absorvida por um indivíduo (EKEN, 2010). Os cromossomos são a estrutura celular base dos testes citogenéticos, sendo compostos de ácido desoxirribonucleico (DNA), o material genético hereditário do ser. Receberam essa denominação do grego – cor (cromo), corpo (some) - devido à intensa coloração que adquirem com alguns corantes (BALAJEE, 2018).

Todo ser humano possui 46 cromossomos, organizados em pares, e modificações em sua estrutura ou em sua quantidade podem estar associadas a exposição a agentes químicos, biológicos ou físicos. A radiação ionizante é um desses agentes capazes de causar danos ao DNA cromossomal, estando o nível de dano diretamente ligado a dose absorvida (CHRISTENSEN, 2014b).

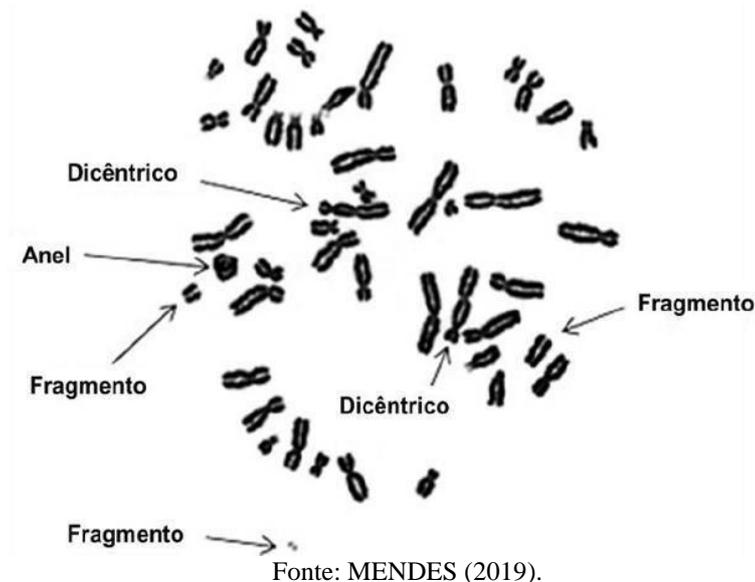
O dano ao DNA nos linfócitos e a correlação com a dose absorvida tem sido a base de diferentes testes citogenéticos que também são úteis em estudos epidemiológicos. Cada um com sua abordagem, esses métodos são: 1) o Ensaio de cromossomos dicêntricos, cujo objetivo é observar a frequência de alterações cromossômicas instáveis (AC) em células em metáfases; 2) o Ensaio de Micronúcleo, que analisa a frequência de micronúcleos (MN) em células binucleadas; e 3) o Ensaio Cometa que mensura o dano em cada célula de forma individual (GÜERCI, 2011; COLLINS, 2014). Em todos esses casos, conhecer a quantidade basal, ou controle, desses marcadores é essencial. Desta forma, na aplicação de uma técnica citogenética, há uma necessidade de um sangue sabidamente não exposto para ser usado como controle, de preferência do próprio indivíduo pré-exposição ou, caso não seja possível, de um indivíduo em condições semelhantes (GÜERCI, 2011; TUCKER, 2013).

### **2.4.1 Ensaio de cromossomos dicêntricos**

As alterações cromossômicas podem ser estáveis, que se perpetuam a cada novo ciclo celular, como por exemplo as translações, ou instáveis (Figura 6), que desaparecem quando a

célula morre, sendo classificadas em fragmentos acêntricos, anéis cromossômicos e cromossomos dicêntricos. Em linfócitos, estas alterações podem durar até 4 anos, mas diminuem com o tempo (GARCIA-SAGREDO, 2008).

Figura 6 – Fotografia de célula metafásica com alterações cromossômicas instáveis (setas)



Cromossomos dicêntricos são cromossomos formados pela junção de dois cromossomos que tiveram seus braços partidos pela radiação ionizante, cada um contribuindo com seu centrômero (dicêntrico = dois centrômeros). Em sua forma completa, cada dicêntrico é acompanhado por um fragmento acêntrico formado pelas partes acêntricas dos cromossomos danificados (CHRISTENSEN, 2014b).

É uma alteração formada especificamente pela exposição à radiação, por isso independem de idade ou sexo do indivíduo, e fácil de ser identificada ao microscópio. Devido a constante exposição natural, humanos podem apresentar frequências espontâneas extremamente baixas de cromossomos dicêntricos, variando de 0,5 a 2 dicêntricos a cada 1000 células, aproximadamente (IAEA, 2011).

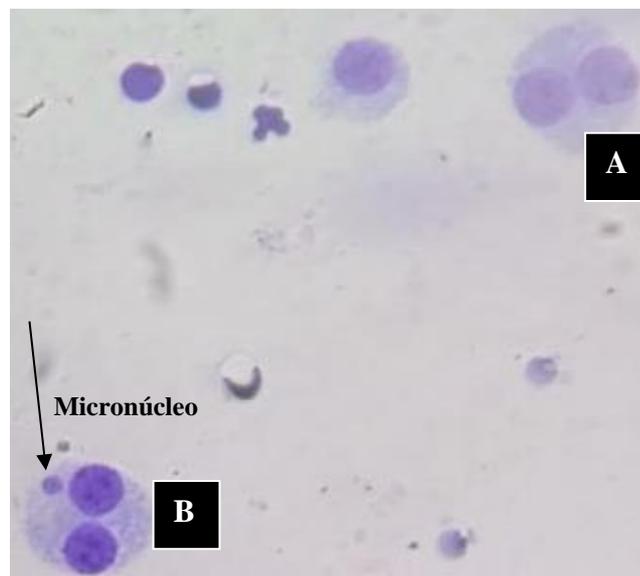
Na década de 1960, as alterações cromossômicas induzidas por radiação começaram a ser utilizados na avaliação de doses, e hoje em dia o ensaio do cromossomo dicêntrico está consolidado como padrão-ouro da biodosimetria (DI GIORGIO, 2011). É possível detectar exposições a 0,1 Gy analisando a partir de 1000 células, e diferenciar se foram parciais ou de corpo inteiro ou a radiações de alta e baixa LET através da distribuição de alteração por célula. (HALL et al, 2017).

### 2.4.2 Ensaio Micronúcleo

Apesar de ser considerado padrão-ouro da biodosimetria, a técnica de dicêntricos apresenta algumas limitações, como um tempo prolongado nas análises e intensa jornada laboratorial, o que dificulta quando um grande número de indivíduos é irradiado (GRUEL, 2013). Estudos realizados por Fenech (2007) demonstraram que o Ensaio de Micronúcleos por Bloqueio da Citocinese (CBMN - *Cytokinesis-block Micronucleous*) poderia ser uma técnica atrativa para o uso alternativo em situações de emergência e triagem, por ter uma análise muito simples de realizar e ter boa acurácia (KANG, 2016).

Os micronúcleos (MN) são originados de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram segregados corretamente nas células filhas durante a divisão celular e permanecem no citoplasma em pequenas vesículas esféricas. As células analisadas são então estimuladas com fito hemaglutinina (Phytohemaglutinin – PHA) a entrarem em divisão celular e logo após esta divisão é bloqueada na fase de citocinese com citocalasina-B (Cyt-B), permitindo a visualização de células binucleadas com ou sem a presença dessas vesículas, os micronúcleos (Figura 7) (FENECH, 2007; PERNOT, 2012).

Figura 7 – Células binucleadas sem (A) e com (B) micronúcleo (seta) (objetiva 40x)



Fonte: O Autor, 2022

O CBMN atualmente é utilizado como ferramenta para teste de genotoxicidade em geral, ou seja, não é específico para radiação, pois micronúcleos podem são formados por agentes clastrogênicos e aneugênicos e alguns eventos epigenéticos, contudo a radiação

ionizante é fortemente clastrogênica, portanto potente indutora de MN, tornando o ensaio bastante confiável (KIRSCH-VOLDERS, 2011; VRAL, 2011). Vale ressaltar que a técnica pode ser refinada com o uso de sondas centroméricas que permitem avaliar a origem dos MN, se são provenientes de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros (IAEA, 2011).

### 2.4.3 Ensaio Cometa

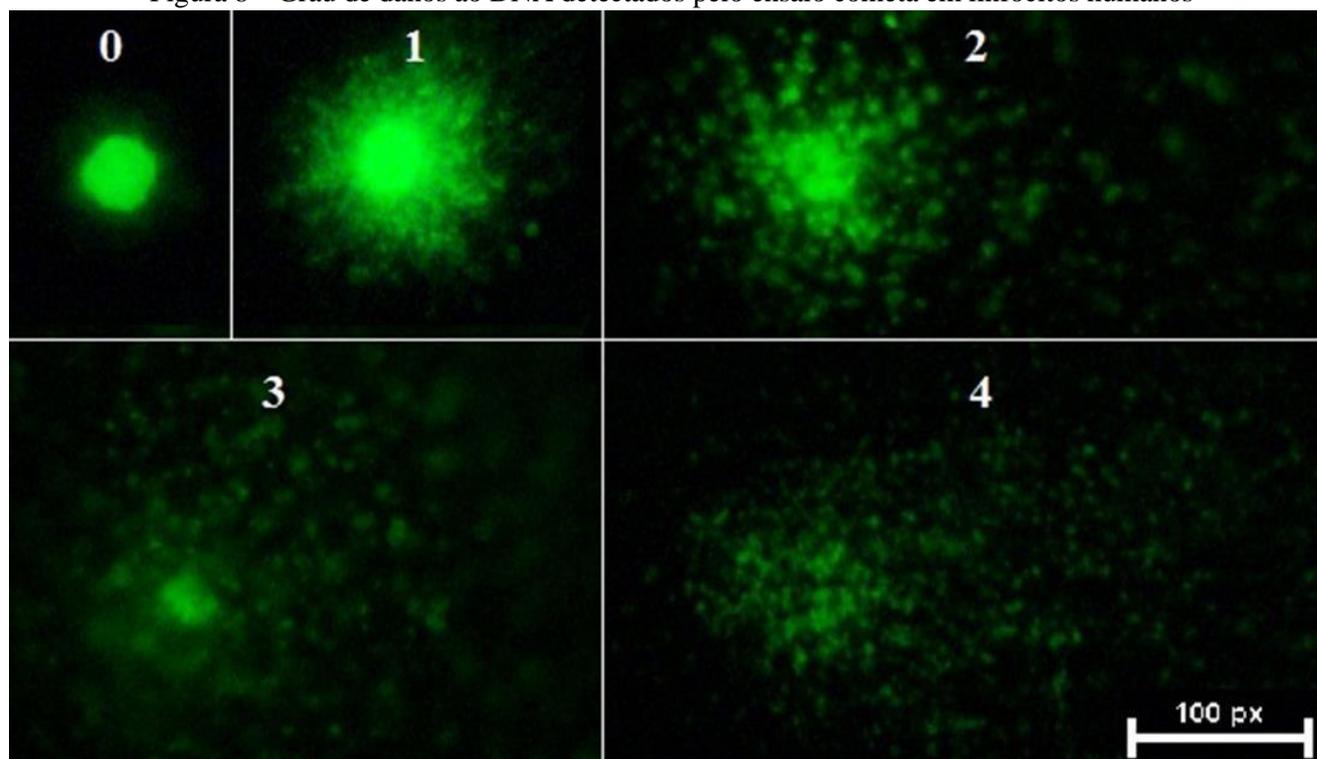
O Ensaio Cometa ou eletroforese em gel de célula única (SCGE) é um teste realizado em eletroforese que permite avaliar as alterações do DNA de células individuais. Essa metodologia foi descrita primeiramente por Ostling e Johanson (1984) onde o método ocorria em condições neutras, o que permitia apenas a detecção de quebras de fita dupla no DNA. Posteriormente, o ensaio passou a ser realizado em condições alcalinas, resultando na detecção de danos de fita simples do DNA, aumentando a aplicação do ensaio. Esta modificação foi realizada por Singh et al. (1988) e é a utilizada atualmente.

A migração do DNA durante o ensaio do cometa ocorre através de diferentes mecanismos, dependendo do nível de danos no DNA e das condições de eletroforese. Fragmentos lineares de DNA de fita simples representam o principal componente do ensaio cometa (FAIRBAIRN et al., 1995). Consiste em um teste de genotoxicidade recomendado para o biomonitoramento ambiental de águas (PANDEY et al., 2011) e populações expostas, diferentes agentes químicos como dejetos industriais, domésticos e agrícolas (BÜCKER et al., 2006), bem como na estimativa de riscos genéticos de misturas complexas e genotoxicidade induzida por agentes físicos como raios X e radiação gama (PAZ-Y-MIÑO et al., 2007). Pode ser realizado em animais e vegetais (SOUZA, 2005), requerendo células vivas, porém com ausência de atividade mitótica (CASTRO, 2004; BÜCKER et al., 2006). É considerada uma técnica simples, de rápida performance e alta sensibilidade (TICE et al., 2000; GÜERCI, 2011).

A técnica requer manipulações muito cuidadosas com as amostras para evitar a indução de quebras de fita de DNA durante a preparação da lâmina, devido à alta sensibilidade do cometa aos danos no DNA (SZETO et al., 2005; ROJAS et al., 2014). Basicamente a amostra com as células são adicionadas a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão que é sobreposta a uma lâmina microscópica previamente recoberta com gel de agarose de alto ponto de fusão. Em seguida é realizada a eletroforese onde pode-se observar que o DNA das células que estiverem danificadas, vão migrar para fora do núcleo celular, formando então, a aparência de um cometa com cauda. O DNA das células que não estiverem danificadas (nucleóides intactos), permanecem dentro do núcleo formando a aparência de um círculo (SILVA, 2019).

Os cometas são classificados e divididos em cinco categorias, de acordo com a extensão da migração de DNA: 0 = sem danos; 1 = baixo nível de danos; 2 = médio nível de danos; 3 = alto nível de danos e 4 = totalmente danificados. A classificação é realizada com base na aparência de cometas, ou seja, comprimento da cauda, diâmetro da cabeça e intensidade, como demonstra a figura 8 (XIAO et al, 2020). Com estas informações é possível calcular o índice de dano apresentado pelo DNA exposto mostrando os efeitos biológicos causados por agentes genotóxicos, auxiliando na prevenção dos efeitos biológicos que os organismos possam apresentar (AZQUETA, 2013)

Figura 8 – Grau de danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa em linfócitos humanos



Fonte: O Autor, 2022.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nos Laboratório de Dosimetria Biológica e no Serviço de Análises Ambientais (SEAMB) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) e no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CB/UFPE) fazendo parte do projeto aprovado para coleta de dados pelo Comitê de Ética envolvendo pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de CAAE 55704016.6.0000.5200 e do parecer consubstanciado 1.533.244 (Anexo A).

#### 3.1 Seleção do doador e coleta das amostras

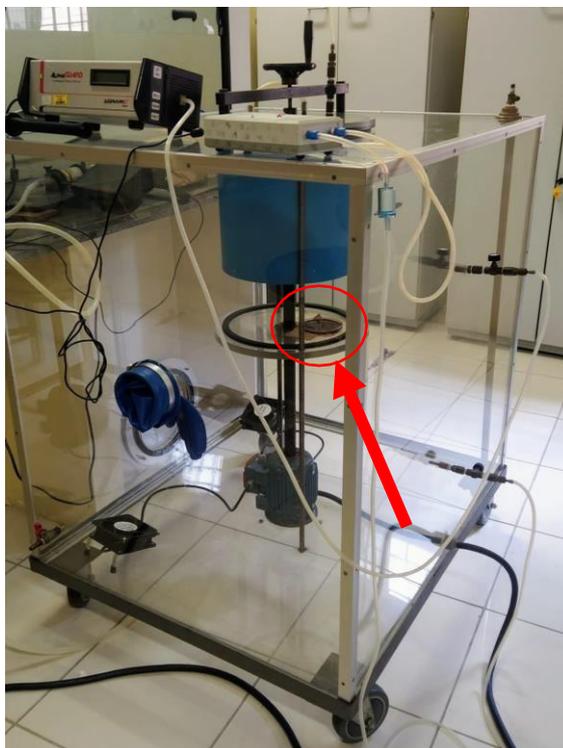
Um voluntário saudável, do sexo feminino, 26 anos, não fumante, foi selecionado após a realização de anamnese por meio do preenchimento de questionário (Anexo B) para verificar se nos últimos seis meses antes da coleta ele foi exposto à radiação ionizante para fins terapêutico, raios X diagnóstico ou consumiu drogas ilícitas, segundo o critério adaptado de Gajendiran et al (2001). Após a seleção houve a assinatura do termo livre e esclarecido pelo voluntário (Anexo C). Em seguida foram coletadas amostras de sangue periférico (30 mL cada) em cada respectivo dia de exposição, por meio de punção venosa a vácuo com tubos heparinizados Vacutainer® com volume de 4mL. No total, foram coletadas 4 amostras, destinadas aos grupos controles e ao grupo de irradiados.

#### 3.2 Exposições das amostras ao Rn<sup>222</sup>

Cada amostra de sangue foi separada primariamente em duas alíquotas de 15mL, uma, considerada grupo controle, não irradiada, mantida à temperatura ambiente e longe da luz e outra, exposta a gás Rn<sup>222</sup>.

A exposição foi realizada no Serviço Análises Ambientais (SEAMB) do CRCN-NE/CNEN na câmara de calibração RN1-CRCN (Farias, 2018) (Figura 9).

Figura 9 – Setup de Exposição das amostras na Câmara de calibração RN1-CRCN.  
Amostra indicada pela seta



Fonte: O Autor, 2022

Foi utilizada uma fonte de  $\text{Ra}^{226}$  ( $t_{1/2}=1.600$  anos) com atividade de 105 kBq (19/01/2021), modelo PYLON RN-1025-100 (Pylon Electronics, Canadá) com taxa de produção constante de  $\text{Rn}^{222}$  (Figura 10).

Figura 10 – Fonte de  $\text{Ra}^{226}$  PYLON RN-1025-100, Pylon Electronics



Fonte: O Autor, 2022

Para as exposições, a fonte de Ra<sup>226</sup> foi selada por 21 dias a fim de obter o equilíbrio secular<sup>1</sup> entre o Ra<sup>226</sup> e o Rn<sup>222</sup>. Após este tempo o gás foi liberado na câmara por 30 minutos, a concentração de atividade média inicial obtida<sup>2</sup> foi de 136,5 KBq/m<sup>3</sup>. As exposições ocorreram em dias subsequentes, aguardando o decaimento da concentração de atividade, a fim de obter as seguintes concentrações: 93,3 kBq/m<sup>3</sup>; 66,1 kBq/m<sup>3</sup>; 26,0 kBq/m<sup>3</sup> e 19,4 kBq/m<sup>3</sup>. O experimento foi monitorado pelo detector de referência AlphaGUARD, que, a cada 10 minutos, realizava a medição da concentração de atividade de Rn<sup>222</sup>.

As amostras foram alocadas em placas de Petri estéreis de vidro com dimensões de 90mm x 15mm e expostas ao gás pelo período de 1 hora.

Ao término das exposições, as alíquotas, controle e irradiada, foram encaminhadas ao Laboratório de Dosimetria Biológica para o tempo de reparo celular numa estufa onde permaneceram por um período de 2 horas a 37°C (IAEA, 2011), posteriormente foram subdivididas em 6 alíquotas de 5mL (3 controles e 3 irradiadas) para cada uma das técnicas aplicadas, como segue.

### **3.3 Ensaio de Alterações Cromossômicas Instáveis (Ensaio de Dicêntrico)**

#### **3.2.1 Cultivo de Células**

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos. Alíquotas de 0,5 ml de sangue total foram adicionadas em frascos de cultura onde foram suplementadas com 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), 1 ml de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich), 0,2 ml de fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich) e 0,06 ml de antibiótico (Sigma-Aldrich).

Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37 °C, por 48 horas em posição inclinada de aproximadamente 45°. Após 46 horas, foi adicionado aos frascos 0,1 ml de colchicina na concentração de 0,0016% (Sigma-Aldrich).

Ao completar 48 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante desprezado e então realizado o choque hipotônico adicionando 7 ml de KCl

---

<sup>1</sup> Equilíbrio Secular pode ser definido pelo equilíbrio entre a taxa de decaimento de um nuclídeo pai e a taxa de acumulação e decaimento de um nuclídeo filho (VENGOSH e WEINTHAL, 2022).

<sup>2</sup> A concentração de atividade média inicial utilizada corresponde a concentração de atividade média máxima que o modelo de câmara se limita (Farias, 2018).

previamente aquecido a 37 °C. Em seguida os tubos permaneceram em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente. Ao término deste período, os tubos foram novamente centrifugado por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante retirado e adicionado o fixador metanol: ácido acético (3:1) até completar 7 ml; o processo de centrifugação e complemento com fixador foi repetido até a obtenção de um sobrenadante límpido, em média três trocas.

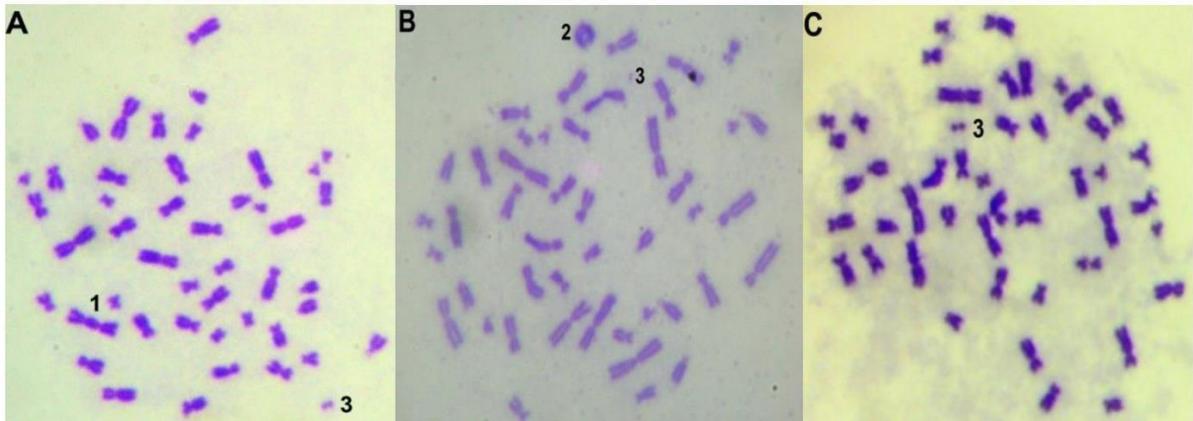
### **3.2.2** Preparação das lâminas

No momento da preparação das lâminas, foi realizada uma última troca de fixador utilizando uma proporção de 2:1 (metanol: ácido acético). As lâminas foram confeccionadas a partir do precipitado de células ressuspensas em 0,5 – 0,75 ml de solução fixadora. O precipitado de células ressuspensas foi gotejado em dois pontos em cada lâmina e essas foram colocadas para secar a temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5 % diluído em tampão fosfato pH 6,8 durante 7 min, em temperatura ambiente, para posterior análise cromossômica ao microscópio óptico.

### **3.2.3** Análise Microscópica

A contagem de alterações cromossômicas foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM 500). As lâminas foram examinadas na sua totalidade e foram contabilizadas para cada indivíduo 150 e 100 metáfases viáveis para as amostras expostas e controle, respectivamente, sendo analisadas por ao menos dois observadores. Entende-se por viáveis aquelas células que não mostraram nenhuma sobreposição de cromossomos e com 46 centrômeros. Foram contabilizadas as alterações cromossômicas instáveis mais comuns: os cromossomos dicêntricos, os fragmentos isolados e os cromossomos em anel (Figura 11).

Figura 11 – Fotografias de células metafásicas com alterações cromossômicas



Fonte: MENDES (2014)

A. Presença de dicêntrico (1) e seu fragmento associado (3); B. Presença de cromossomo em anel (2) e seu fragmento associado (3); C. Presença de um fragmento acêntrico isolado (3)

### 3.3 Ensaio de Micronúcleo por bloqueio de citocinese

#### 3.3.1 Cultivo de Células

As preparações citológicas para as análises dos micronúcleos também foram obtidas a partir de cultura de linfócitos, com algumas modificações do ensaio supra descrito. Para tal, foram adicionadas 0,5 ml de sangue total em frascos de cultura onde foram suplementados com 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), 1 ml de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich) e apenas 0,1 ml de fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich) e 0,06 ml de antibiótico (Sigma-Aldrich). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C em ângulo de aproximadamente 45°, desta vez por 68 horas, sendo adicionado após 24 horas 0,02 ml de citocalasina B (Sigma). Ao completar às 68 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm o sobrenadante desprezado e adicionado 7 ml de KCl gelado, para que ocorresse o choque hipotônico. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante retirado e adicionado o fixador metanol: ácido acético (10:1), diluídos em solução de ringer (1:1) até completar 5 ml.

#### 3.3.2 Preparação das lâminas

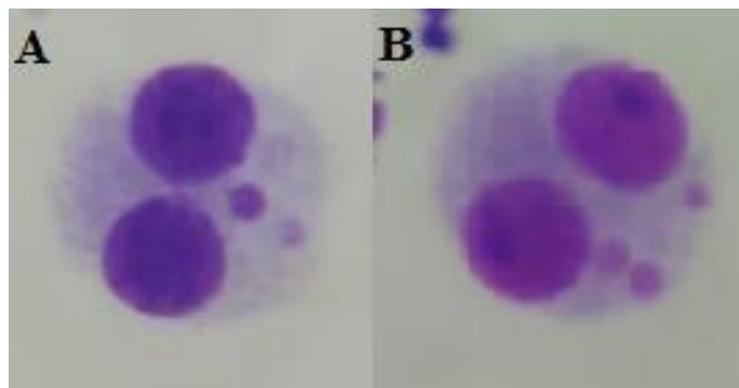
Para a preparação das lâminas, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador, sem a diluição em Ringer, quanto o necessário para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

Após o processo de fixação, foram confeccionadas lâminas a partir do precipitado de células ressuspenso em 0,75 ml de solução fixadora. O precipitado de células ressuspenso foi então delicadamente gotejado em dois pontos na lâmina e posta para secar a temperatura ambiente durante 24h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, diluídos em tampão fosfato pH 6,8, durante 20 minutos para posterior análise microscópica.

### 3.3.3 Análise Microscópica

A contagem de micronúcleos foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM 500). Foram contabilizadas, para cada amostra irradiada e para o controle, 1500 e 4000 células binucleadas (BN) viáveis, respectivamente. As análises foram realizadas por dois observadores independentes, sendo 750 e 2000 binucleadas para cada. Os seguintes critérios para caracterizar uma célula binucleada viável foram considerados: as células deveriam ser binucleadas (BN); os dois os núcleos deveriam apresentar tamanhos, coloração e intensidade de coloração iguais, e membranas nucleoplasmáticas intactas; os núcleos poderiam se tocar, mas não se sobrepor a ponto das barreiras de suas membranas não serem distinguíveis. Em relação aos MN, o critério de aceitação define que sejam visualizados em células binucleadas, com 1/6 a 1/3 do diâmetro dos núcleos principais, não refringentes e com coloração igual ou levemente mais forte que os núcleos principais, e não devem se sobrepor a um dos núcleos assim sendo a membrana micronuclear deve ser distinta da membrana nuclear conforme observado na Figura 12 (FENECH, 2007; IAEA, 2011).

Figura 12 – Fotografia de células binucleadas com dois micronúcleos (A) e com três micronúcleos (B) (objetiva 100x)



Fonte: O Autor, 2022.

### 3.3.4 Análise Estatística

Após a obtenção dos dados dos ensaios de dicêntrico e de micronúcleo foram realizadas análises estatísticas utilizando o programa R, a fim de comparar os grupos expostos e o grupo controle.

Foi avaliada a distribuição de Poisson que expressa a probabilidade da ocorrência de eventos ao acaso, através do teste  $u$  de Papworth, que é uma unidade normalizada do índice de dispersão ( $\sigma^2/y$ ) onde valores de  $u$  superiores a 1,96 indicam sobredispersão significativa e os valores de  $u < -1,96$  indicam a subdispersão significativa.

Da mesma forma, foi realizado o teste de  $\chi^2$  (chi-quadrado), a fim de testar a homogeneidade entre amostras, avaliando se há diferença estatística significativa entre elas, o valor de  $p$  está associado aos graus de liberdade adotado e fornece informação se as diferenças observadas foram devido ao acaso, o nível de significância é comumente definido em 95%. (IAEA,2011).

## 3.4 Ensaio Cometa

Uma alíquota de 0,1 ml de sangue periférico foi devidamente homogeneizada com 0,1 ml de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% dissolvida em PBS a pH 7,4. Imediatamente, este homogenato foi colocado sobre uma lâmina de microscópio, previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% dissolvida em PBS, coberto com lamínula e mantido a 4 °C. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em solução de lise por 12 horas a 4 °C. Após o processo de lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução de tampão alcalino, pH 13,0, por 20 minutos. Posteriormente, a eletroforese foi iniciada durante 20 min (4 °C) a 0,74 V/cm e 300 mA. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) por 15 minutos e fixadas com álcool absoluto por 10 minutos. Em seguida as lâminas foram coradas com 50  $\mu$ L de uma solução de SYBR safe (Invitrogen) (1:500).

Foram analisadas 100 células em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm. Sendo os níveis de dano nos nucleóides classificados em cinco classes: 0, 1, 2, 3 e 4 (Figura 5) segundo o método de Collins et al. (2008) onde, a classe 0 representa células não danificadas enquanto as classes 1–4 representam danos em níveis

crecentes no material genético. Os cometas foram avaliados por meio do Índice de Danos (ID) e Frequência de Danos (FD%). Os valores do ID foram obtidos, para cada indivíduo, variando de 0 a 400 segundo a equação 1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

$$ID = 0. (n_0) + 1. (n_1) + 2. (n_2) + 3. (n_3) + 4. (n_4) \quad (1)$$

Onde:

ID = índice de danos

n = Número de cometas quanto a classe

O segundo parâmetro, FD (%) foi calculado como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados, que vai da classe 0 a classe 4 ( $N_T$ ), como apresentado na Equação 2:

$$FD (\%) = \frac{[(N_T - N_0) \cdot 100]}{N_T} \quad (2)$$

Onde:

FD (%) = Frequência de danos

$N_T$  = Número Total

$N_0$  = Número Classe 0

A análise estatística foi realizada comparando-se os grupos controle e expostos por meio da Análise de Variância (ANOVA) e do teste post-hoc de Bonferroni com a utilização do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, Califórnia, USA), as diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio de Alterações Cromossômicas Instáveis (Ensaio de Dicêntrico)

Foram analisadas no total 1000 metáfases viáveis, sendo 600 para amostras expostas a radiação, em diferentes concentrações de atividade e 400 para as amostras controle. Para se determinar o background, foi realizado o somatório das metáfases analisadas nos controles e suas respectivas alterações cromossômicas, sendo esse grupo representado pela concentração de atividade 0,0 kBq/m<sup>3</sup>.

Na tabela 2 são demonstradas as distribuições intercelulares das alterações cromossômicas instáveis observadas e seus respectivos índices estatísticos, sendo elas dicêntricas (Dic) e fragmentos acêntricos isolados (Frag i). Não foram observados anéis cromossômicos em nenhuma das concentrações.

Tabela 2 – Distribuições intercelulares de dicêntricos e de fragmentos isolados com suas respectivas frequências (médias), variâncias, índices de dispersão e valores de  $u$

Concentração de Atividade (kBq/m <sup>3</sup> )	Total de Metáfases	Dic	Distribuição Intercelular (Dic)						
			Y	0	1	2	$\sigma^2$	$\sigma^2/y$	$U$
			0	400	1	0.003	399	1	0
19,4	150	4	0.027	146	4	0	0.026	0.980	-0.201
26,0	150	6	0.040	144	6	0	0.039	0.966	-0.317
66,1	150	9	0.060	141	9	0	0.057	0.946	-0.492
93,3	150	15	0.100	137	11	2	0.117	1.174	1.559

Concentração de Atividade (kBq/m <sup>3</sup> )	Total de Metáfases	Frag i	Distribuição Intercelular (Frag i)						
			Y	0	1	2	$\sigma^2$	$\sigma^2/y$	$U$
			0	400	7	0.018	393	7	0
19,4	150	4	0.027	146	4	0	0.027	0.503	-4.583
26,0	150	8	0.053	142	8	0	0.052	0.562	-3.925
66,1	150	8	0.053	142	8	0	0.054	0.480	-4.622
93,3	150	17	0.113	133	17	0	0.111	0.521	-4.197

(Y – frequência (média);  $\sigma^2$  - variância;  $\sigma^2/y$  – índice de dispersão).

Fonte: O Autor, 2022

Observa-se que que na análise de dicêntricos (DIC) o índice  $u$  segue a distribuição de Poisson em todas as concentrações. O comportamento esperado na avaliação dessa alteração cromossômica para irradiações de alta LET, que depositam sua energia nas células em pacotes que são distribuídos através de trilhas de ionização de forma não aleatória, é o de sobredispersão, onde a variância excede a média e o  $u > 1,96$ . Entretanto a quantidade de trilhas será menor em doses mais baixas seguindo o comportamento esperado para radiações de baixa LET (Di GIOGIO, 2004; IAEA,2011).

Em um trabalho muito similar Hamza et al (2008), conseguiu estimar a dose em Gy a partir do uso de uma célula de Lucas, onde a menor concentração de atividade utilizada, 122 KBq/m<sup>3</sup> corresponde a 0,01 mGy e também segue a distribuição de Poisson. Somente a partir da concentração de 359 KBq/m<sup>3</sup> até 1593210 KBq/m<sup>3</sup> o comportamento esperado de sobredispersão é observado em 14 de 16 amostras (Tabela 3). Ao que indica que as concentrações do presente trabalho não são suficientemente altas e seguem o modelo esperado para radiações de baixa LET, estando assim dentro do esperado.

Um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de dicêntricos em relação ao grupo controle é observado em todas as concentrações, segundo o teste de qui-quadrado ( $p$ -value = 0,05). Também foi registrado um aumento absoluto proporcional entre as doses irradiadas, contudo, estatisticamente não era significativo ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a recomendação da IAEA (2011) para a redução de incertezas estatísticas em células irradiadas *in vitro* é de pelo menos 500 metáfases contabilizadas por amostra. Número que não conseguiu ser atingido neste trabalho por conta das regras de laboratório devido pandemia e o prazo

Meenakshi e Mohankumar (2013) também observaram uma frequência significativa ( $p < 0,0001$ ) de cromossomos dicêntricos em linfócitos de voluntários fumantes e não fumantes induzidos pela exposição *in vitro* ao radônio, mesmo em baixas doses, reforçando o uso desse biomarcador como padrão ouro na biodosimetria e provando sua eficiência como bom marcador para exposição ao radônio (ROBERTSON et al, 2013).

Tabela 3 – Análise da Frequência de dicêntricos e Distribuição de Poisson

Concentração de Atividade (kBq/m <sup>3</sup> )	Dose (mGy)	Total de Metáfases	Y	U	Distribuição
122	0,010	1337	0,00149	-	DP
239	0,019	865	0,00231	- 0,03	DP
265	0,021	418	0,00239	-	-
359	0,028	1442	0,00277	+15,44	SD
89325	7,146	1713	0,00525	+13,66	SD
92648	7,412	1580	0,00569	+6,48	SD
100565	8,045	1035	0,00579	+24,81	SD
112341	8,987	349	0,00573	-0,05	DP
216106	17,288	1632	0,00735	+4,77	SD
424132	33,930	294	0,01020	-0,10	DP
424532	33,962	809	0,01112	+18,76	SD
425314	34,025	834	0,01318	+11,43	SD
438524	35,081	1452	0,01377	+27,29	SD
468725	37,498	1647	0,01639	+12,54	SD
1256354	100,508	1506	0,02058	+15,65	SD
1339843	107,187	375	0,02400	+9,39	SD
1342915	107,432	1039	0,02502	+11,96	SD
1498132	119,850	872	0,03096	+7,25	SD
1593210	127,456	519	0,03275	+11,22	SD

Fonte: HAMZA et al, 2008 (adaptado)

Y = Frequência; DP = Distribuição de Poisson, SD = Sobre Distribuição.

## 4.2 Ensaio de Micronúcleo por Bloqueio de Citocinese

Para análise de micronúcleos foram contabilizadas um total de 10000 células binucleadas, sendo 1000 para cada controle e 1500 para cada amostra irradiada. Vale ressaltar que, as células das amostras controle foram somadas, a fim de se obter o background, representando aqui a concentração de atividade 0,0 (zero) KBq/m<sup>3</sup>, totalizando 4000 células.

A tabela 4 apresenta a distribuição intercelular de micronúcleos e os índices estatísticos observados.

Tabela 4 – Distribuições intercelulares micronúcleos com suas respectivas frequências (médias), variâncias, índices de dispersão e valores de  $u$ .

Concentração de Atividade (KBq/m <sup>3</sup> )	Total de Binucleadas	Mn	Distribuição Intercelular (Mn)								
			Y	0	1	2	3	$\sigma^2$	$\sigma^2/y$	$U$	
0	4000	13	0.003	3987	13				0.003	0.997	-0.140
19,4	1500	9	0.006	1492	7	1			0.007	1.217	6.302
26,0	1500	7	0.005	1493	7				0.005	0.996	-0.118
66,1	1500	18	0.012	1484	15		1		0.016	1.322	9.077
93,3	1500	23	0.015	1477	23				0.015	0.985	-0.411

Fonte: O Autor, 2022

(Y – frequência (média);  $\sigma^2$  - variância;  $\sigma^2/y$  – índice de dispersão).

A quantidade de células binucleada (BN) mínima para se determinar a frequência de micronúcleos (MN) é 1000, sendo esperado o 0 a 40 MN por 1000 BN em amostras de *background*, podendo haver uma distribuição de variável de 0 até 3 MN por célula binucleada. (FENECH, 2007; SINITSKY, 2014). Essa variação relativamente alta em relação a técnica de dicêntricos, da qual é vista como uma alternativa pela IAEA, é influenciada por fatores clastrogênicos e aneugênicos ambientais, além de idade e gênero (GIORGIO, 1994; RAWOJÉ, 2015)

A tendência a maior distribuição intercelular é característica do CBMN, entretanto também pode ser relacionada com a exposição à radiação alta LET devido ao seu já explicado mecanismo de deposição de energia. Esse tipo de distribuição predispõe uma sobredispersão evidenciada pelo índice  $u$  de Poisson como observado na tabela 4 (IAEA, 2011; DI GIORGIO, 2004).

As amostras analisadas neste trabalho, apesar de atenderem aos padrões de análise determinados, não apresentam diferença significativa entre si, sendo possível observar que mesmo na concentração de atividade mais alta utilizada, 93,3 kBq/m<sup>3</sup>, a frequência obtida está dentro do esperado para o background. Nesses casos, onde há baixa frequência de MN, a leitura de 2000 células ou mais pode render resultados mais robustos (FENECH, 2007). Apenas as amostras em que foram encontradas mais de um MN/ célula apresentaram sobredispersão ( $u > 1,96$ ).

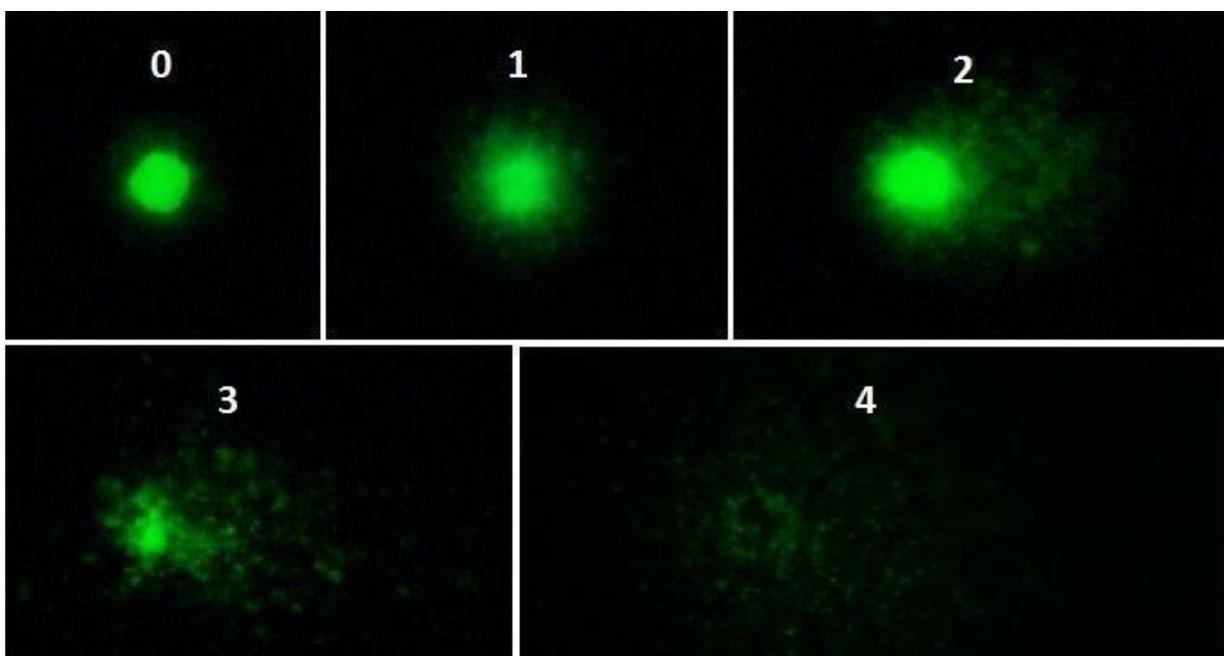
Hamza e Mohankumar (2009) analisou linfócitos humanos em 13 amostras irradiadas com radônio, numa variação de concentração de 6499 a 1498132 kBq/m<sup>3</sup>, correspondentes a baixas doses em Gy (0,52 a 120 mGy). No geral, uma média de 1000 BN foram contabilizadas por amostra. A maior parte das frequências (8 de 13) encontradas pelo pesquisador também margeou a esperada para o BG. Entretanto, também encontrou nas doses de 7,1 mGy e 7,4 mGy 8 e 7 MN em uma única BN. Todas as suas amostras apresentaram a sobredispersão esperada para MN.

Meenakish (2019) ao propor uma correlação entre os ensaios de dicêntricos e micronúcleos expostos a baixas doses de radônio, indicou a eficiência no uso de ambos os ensaios, mesmo com baixas frequências de MN, pois evidenciou o aumento dos MN de acordo com a dose numa mesma proporção do aumento de fragmentos acêntricos, também reforçou o uso de pontes nucleoplasmáticas como bom marcador para a exposição a radônio usado ou não em conjunto com a contagem de dicêntricos (MEENAKISH, 2017).

### 4.3 Ensaio Cometa

Na figura 13 pode-se observar a ocorrência de células com diferentes graus de danos no DNA de linfócitos expostos ao Radônio-222, segundo a classificação de Collins (2008) onde, 0 significa ausência de danos e os graus de 1 a 4, representa danos crescentes ao DNA das células estudadas.

Figura 13 – Células observadas em ordem crescente de dano



Fonte: O Autor, 2022.

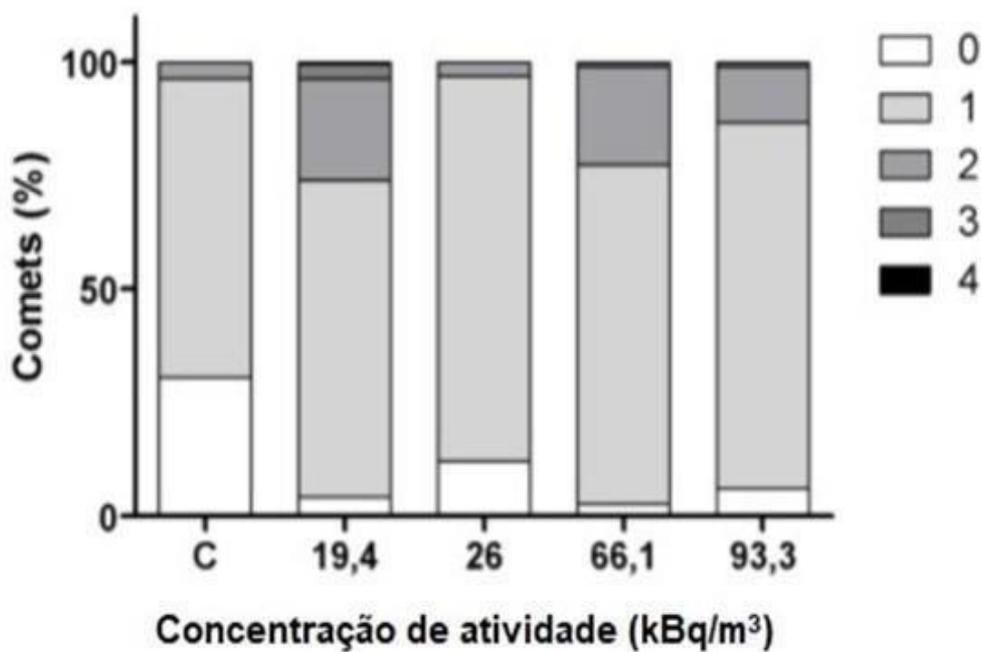
Na tabela 5 pode-se observar os graus de danos do DNA dos linfócitos, bem como o índice de danos (ID) e de frequência de danos (FD). Ao analisar a porcentagem de níveis de cometa em cada grupo, observou-se que a presença de radônio tem efeito genotóxico sobre os linfócitos uma vez que apresentaram número reduzido de nucleóide ao nível 0 quando comparado ao grupo controle. Além disso, cometas de danos 3 e 4 ocorreram em amostras de linfócitos expostos ao radônio, o que demonstra maior fragmentação do DNA desses grupos em relação ao grupo controle. Quando foi analisado os níveis de danos separadamente nota-se que os danos 1 tanto do grupo controle quanto do grupo exposto não apresentaram diferença estatística. Entretanto a partir do nível 2 em diante fica evidente uma maior incidência de danos no DNA dos linfócitos expostos, exceto para a concentração de 26 kBq/m<sup>3</sup>, que apresentou maior danos de nível 1 (84,67) e 3,17 no nível 2 (Figura 13).

Tabela 5 – Distribuições de danos entre as amostras com seus respectivos Índice de Danos (DI) e Frequência de Danos (DF)

Concentração de atividade (KBq/m <sup>3</sup> )	Graus de dano (unid)						DI	DF (%)
	0	1	2	3	4	TOTAL		
C	30,5	65,83	3,67	0	0	100	73,2 ± 9,31	65 ± 2,5
19,4	4,17	69,83	22,33	3,17	0,5	100	126,0 ± 7,0	96 ± 1,3
26,0	12,17	84,67	3,17	0	0	100	91,0 ± 7,2	88 ± 4
66,1	2,67	74,67	21,67	1,0	0	100	121,0 ± 5,5	97 ± 0,6
93,3	7,67	70,83	18,83	2,67	0	100	116,5 ± 6,9	92 ± 4,9

Fonte: O Autor, 2022

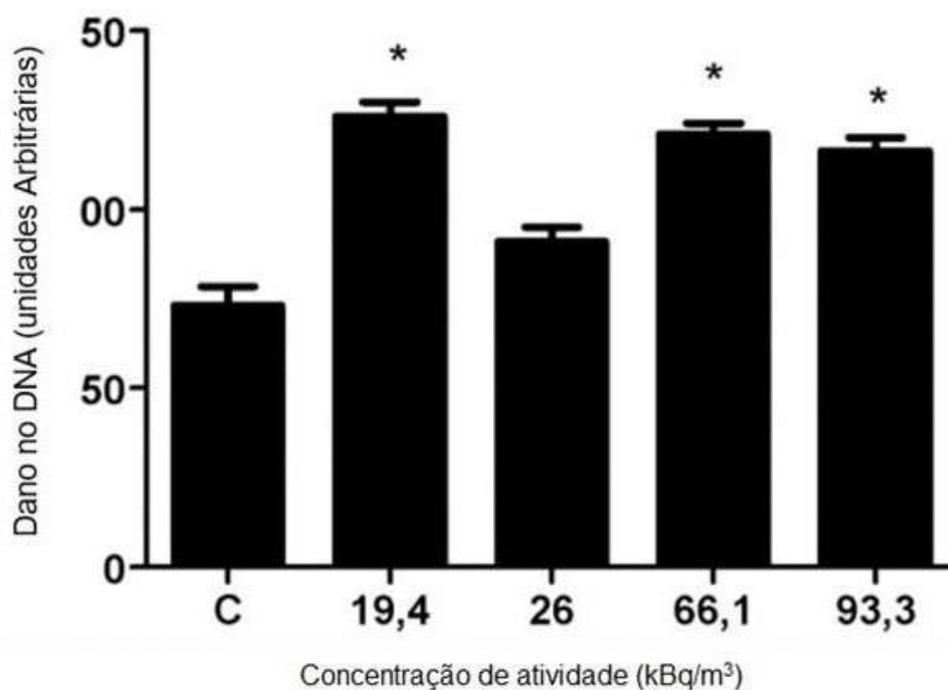
Figura 14 –Gráfico de Score de Danos por amostra



Fonte: O Autor, 2022

A análise do índice de dano (tabela 5, Figura 14) evidenciou a diferença estatística do grau de genotoxicidade entre os grupos expostos e o grupo controle por meio de uma análise comparada. No entanto, quando foi realizado a comparação entre os grupos expostos, ficou comprovado que não há diferença estatística entre eles, ou seja, mesmo com aumento da concentração de radônio não houve diferença estatisticamente significativa. Portanto as concentrações de radônio utilizada neste trabalho foram genotóxicas para os linfócitos humanos.

Figura 15 - Índice de danos no DNA em linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de  $Rn^{222}$  e não expostos. Resultados significativos em comparação com o controle e entre os grupos expostos ( $p < 0,05$ )

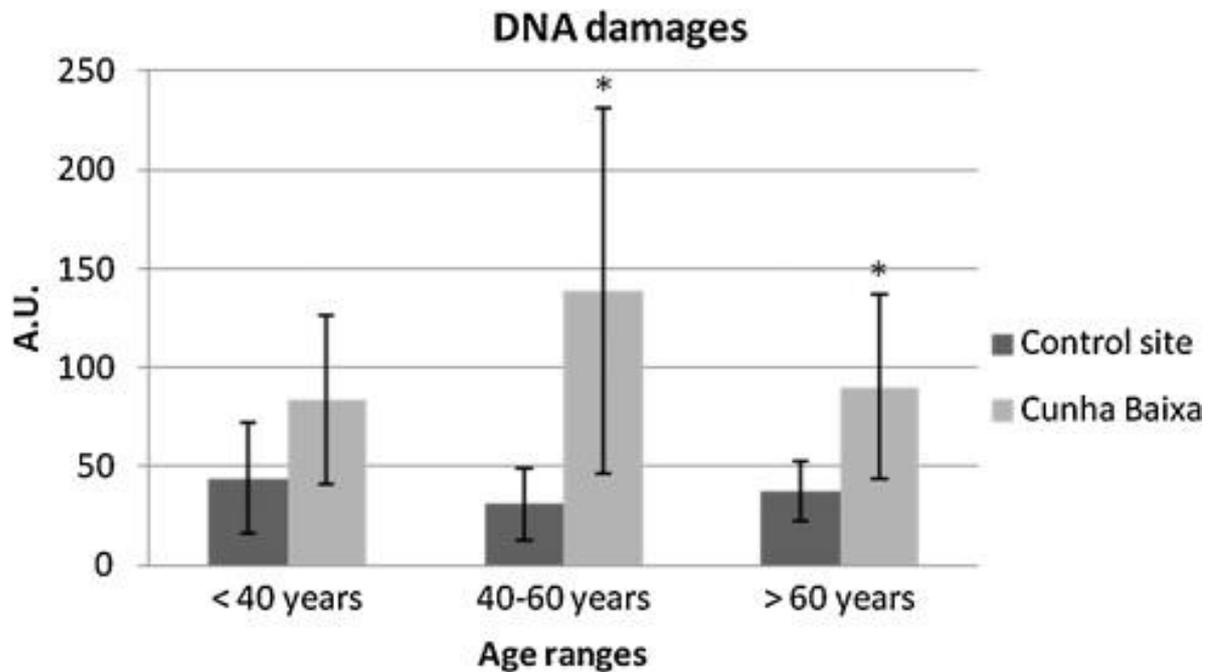


Fonte: O Autor, 2022

A análise da frequência de danos (FD) corrobora com os dados encontrados no DI, ou seja, todas as exposições ao  $Rn^{222}$  foram genotóxicas ao DNA dos linfócitos. A realização do ensaio cometa confirma que os linfócitos expostos ao radônio apresentaram danos genotóxicos como foi apresentado na técnica citogenética de análise das alterações cromossômicas e de micronúcleo realizadas neste estudo.

O trabalho realizado por Lourenço et al (2013) avaliou o dano no DNA através do ensaio cometa da população da vila Cunha Baixa, Portugal, região onde havia uma mina de urânio explorada até 1993. A equipe de pesquisadores encontrou perdas significativas na integridade do DNA dos indivíduos acima de 40 anos (Figura 15). A diferença significativa demonstra a exposição elevada a radiação da população estudada em relação a indivíduos de uma localidade controle de níveis de radiação dentro da normalidade.

Figura 16 - Integridade do DNA do sangue total na população que habita os locais de referência (cinza claro) e contaminado (cinza escuro). Valores de média  $\pm$  desvio padrão ( $p < 0,05$ )



Fonte: LOURENÇO et al (2013)

Walczak et al (2020) em sua pesquisa buscou determinar efeitos genotóxicos advindos da exposição ao radônio natural nos habitantes de Kowary, Polônia. Para o trabalho foram determinados dois grupos populacionais: expostos a baixas concentrações de atividade de radônio ( $< 100$  Bq/m<sup>3</sup>) e expostos a alta concentração de atividade de radônio ( $> 100$  Bq/m<sup>3</sup>). Um dano significativamente maior ( $p = 0,034$ ) ao DNA foi observado no grupo de alta exposição do radônio em comparação ao grupo de baixa exposição. Estes trabalhos reafirmam a sensibilidade do ensaio cometa para avaliação de danos genotóxicos.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados com linfócitos humanos expostos a diferentes concentrações de Radônio ( $\text{Rn}^{222}$ ), conclui-se que:

- A técnica de dicêntrico mostrou-se sensível em evidenciar à exposição à radiação emitida pelo radônio posto que apresentou diferença estatística entre o grupo controle e irradiado. Quanto a caracterização do nível dessa exposição foi considerada promissora, visto que é observado um aumento linear de acordo com o aumento da concentração, o que é esperado na literatura, ainda que não haja diferença significativa entre os valores. O aumento das análises para, pelo menos 500 metáfases poderá ser capaz de ampliar esse aumento a valores significativos.
- A técnica de micronúcleo não foi suficientemente sensível para apresentar diferença estatística entre os grupos analisados (exposto e controle) e as alterações encontradas permaneceram na frequência basal esperada pela literatura dentro dos parâmetros utilizados nesse trabalho.
- O ensaio cometa mostra-se promissor como indicador de exposição de linfócitos ao radônio pois demonstrou, na avaliação do ID, uma diferença significativa entre os grupos expostos e controle, sendo o ID de todos os expostos maiores que o controle. Entretanto não houve diferença entre os ID das amostras que compunham o grupo exposto não sendo possível apontar o nível de exposição.
- Das três técnicas avaliadas, a técnica de dicêntrico e o ensaio cometa se mostraram adequados a evidenciar a exposição à radiação, diferenciando amostras expostas e não expostas, sendo a técnica de dicêntrico animadora para a avaliação do nível de exposição. A técnica de micronúcleo aparentemente não foi adequada a esse tipo de avaliação necessitando de estudos com diferentes parâmetros.

## **6 PERSPECTIVAS**

- Dar prosseguimento as análises da técnica de dicêntricos com a finalidade de aumentar o número de metáfases contabilizadas a um mínimo de 500.
- Realizar a coleta e subsequente análise de amostras obtidas de indivíduos moradores da região urano fosfática de Pernambuco – Paraíba.

## REFERÊNCIAS

- ABO-ELMAGD, M.; DAIF, Manal M.; EISSA, H. M. Cytogenetic effects of radon inhalation. **Radiation measurements**, v. 43, n. 7, p. 1265-1269, 2008.
- AL-ESHAikh, Mohammad A.; KADACHI, Ahmed N.; SARFRAZ, M. Mansoor. Determination of uranium content in phosphate ores using different measurement techniques. **Journal of King Saud University-Engineering Sciences**, v. 28, n. 1, p. 41-46, 2016.
- AL-ZOUGHLOO, Mustafa; KREWSKI, Daniel. Health effects of radon: a review of the literature. **International journal of radiation biology**, v. 85, n. 1, p. 57-69, 2009.
- AMARAL, Ademir. Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 229-234, 2005.
- AMARAL, Ademir; FERNANDES, Thiago Salazar; CAVALCANTI, Mariana Brayner. Bioindicators in radiation protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. SPE, p. 91-96, 2008.
- ANGERER, Jürgen; EWERS, Ulrich; WILHELM, Michael. Human biomonitoring: state of the art. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, n. 3-4, p. 201-228, 2007.
- AZQUETA, Amaya; COLLINS, Andrew R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949-968, 2013.
- BALAJEE, Adayabalam S.; HANDE, M. Prakash. History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, p. 3-12, 2018.
- BOFF, Cleber Adelar; BASTOS, Rodrigo Oliveira; MELQUIADES, Fábio Luiz. Práticas experimentais no ensino de física nuclear utilizando material de baixo custo. **Caderno Brasileiro de Ensino de Física**, v. 34, n. 1, p. 236-247, 2017.
- BUCKER, A.; CARVALHO, W. E ALVES-GOMES, JA . Avaliação de mutagenicidade e gentotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposto a benzeno. *Acta amazonica* 36 (3), 357-364, 2006
- CARTER, Rachel J. et al. Complex DNA damage induced by high linear energy transfer alpha-particles and protons triggers a specific cellular DNA damage response. **International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics**, v. 100, n. 3, p. 776-784, 2018.
- CHARLES, Monty. UNSCEAR Report 2000: sources and effects of ionizing radiation. **Journal of Radiological Protection**, v. 21, n. 1, p. 83, 2001.
- CHRISTENSEN, Doran M. et al. Management of ionizing radiation injuries and illnesses, part 3: radiobiology and health effects of ionizing radiation. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 114, n. 7, p. 556-565, 2014b.
- CHRISTENSEN, Doran M.; IDDINS, Carol J.; SUGARMAN, Stephen L. Ionizing radiation injuries and illnesses. **Emergency Medicine Clinics**, v. 32, n. 1, p. 245-265, 2014a.

- COLLINS, Andrew et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 759, p. 27-39, 2014..
- COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
- CORRÊA, Janine Nicolosi et al. Monitoramento da radioatividade alfa relacionada ao radônio-222 em águas de poços da região metropolitana de Curitiba (PR). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, p. 243-250, 2015.
- DA COSTA DANTAS, Richelly et al. Natural radioactivity in Brazil: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 1, p. 143-157, 2020.
- DAINIYAK, Nicholas. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. **Experimental hematology**, v. 30, n. 6, p. 513-528, 2002.
- DARBY, Sarah C. et al. Radon and cancers other than lung cancer in underground miners: a collaborative analysis of 11 studies. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 5, p. 378-384, 1995.
- DARKO, Godfred et al. Distribution of natural and artificial radioactivity in soils, water and tuber crops. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 6, p. 1-11, 2015.
- DE MATTOS, Mayra. Desenvolvimento de equipamento de proteção individual para blindagem da radiação beta no cristalino. **Revista Eletrônica de Gestão, Engenharia e Tecnologia da Faculdade de Tecnologia de Piracicaba**, v. 1, n. 1, 2016.
- DI GIORGIO, M. et al. Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation of triage and routine mode results by robust methods. **Radiation research**, v. 175, n. 5, p. 638-649, 2011.
- DI GIORGIO, M. et al. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by heavy charged particles in track segment mode. **Radiation protection dosimetry**, v. 108, n. 1, p. 47-53, 2004.
- DO AMARAL, Déric Soares et al. Radônio-222 em águas de poços em áreas do fosforito uranífero da região metropolitana do Recife. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3920-3926, 2019.
- DOS SANTOS AMARAL, Romilton et al. Intake of uranium and radium-226 due to food crops consumption in the phosphate region of Pernambuco–Brazil. **Journal of environmental radioactivity**, v. 82, n. 3, p. 383-393, 2005.
- DUGGAL, Vikas et al. Measurement of radon concentration in drinking water in Bhiwani district of Haryana. **Journal of the Geological Society of India**, v. 91, n. 6, p. 700-703, 2018.
- EKEN, Ayşe et al. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of hospital staff occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. **Toxicology and industrial health**, v. 26, n. 5, p. 273-280, 2010.
- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIELD, R.W. Radon: An Overview of Health Effects. **In Encyclopedia of Environmental Health**, 467–475. Elsevier B.V, 2019.

FORAY, Nicolas; COLIN, Catherine; BOURGUIGNON, Michel. 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence. 2012.

GAJENDIRAN, Natarajan et al. Neutron-induced adaptive response studied in go human lymphocytes using the comet assay. **Journal of radiation research**, v. 42, n. 1, p. 91-101, 2001.

GARCIA-SAGREDO, J. M. Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 6-7, p. 363-375, 2008.

GHOSH P, Banerjee M, De Chaudhuri S, Das JK, Sarma N, GHOSH, Pritha et al. Increased chromosome aberration frequencies in the Bowen's patients compared to non-cancerous skin lesions individuals exposed to arsenic. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 632, n. 1-2, p. 104-110, 2007.

GIORGIO, C. Di et al. The micronucleus assay in human lymphocytes: screening for inter-individual variability and application to biomonitoring. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 2, p. 313-317, 1994.

GRIDLEY, Daila S.; PECAUT, Michael J.; NELSON, Gregory A. Total-body irradiation with high-LET particles: acute and chronic effects on the immune system. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 3, p. R677-R688, 2002.

GROSCHKE, Bernd et al. Lung cancer risk among German male uranium miners: a cohort study, 1946–1998. **British journal of cancer**, v. 95, n. 9, p. 1280-1287, 2006.

GRUEL, Gaetan et al. Biological dosimetry by automated dicentric scoring in a simulated emergency. **Radiation research**, v. 179, n. 5, p. 557-569, 2013.

GÜERCI, A.; ZÚÑIGA, L.; MARCOS, R. Construction and validation of a dose-response curve using the comet assay to determine human radiosensitivity to ionizing radiation. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 74, n. 15-16, p. 1087-1093, 2011.

HADA, Megumi; GEORGAKILAS, Alexandros G. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. **Journal of radiation research**, p. 0804090035-0804090035, 2008.

HALL, Janet et al. Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies—an update. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 59-84, 2017.

HAMZA, V. Zareena et al. A simple method to irradiate blood cells in vitro with radon gas. **Radiation protection dosimetry**, v. 130, n. 3, p. 343-350, 2008.

HAMZA, V. Zareena; MOHANKUMAR, Mary N. Cytogenetic damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to radon. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 661, n. 1-2, p. 1-9, 2009.

HORNUNG RW, Meinhardt TJ. 1987. Quantitative risk assessment of lung-cancer in United States uranium miners. **Health Physics** 52:417–430.

HOSODA, Masahiro et al. Machine learning as a tool for analysing the impact of environmental parameters on the radon exhalation rate from soil. **Radiation Measurements**, v. 138, p. 106402, 2020.

HOWE, G. R. et al. Lung cancer mortality (1950-80) in relation to radon daughter exposure in a cohort of workers at the Eldorado Port Radium uranium mine: possible modification of risk by exposure rate. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 79, n. 6, p. 1255-1260, 1987.

HOWE, Geoffrey R. et al. Lung cancer mortality (1950–80) in relation to radon daughter exposure in a cohort of workers at the Eldorado Beaverlodge uranium mine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 77, n. 2, p. 357-362, 1986.

INSTITUTO DE RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA – IRD. **Manual da OMS sobre radônio em ambientes internos: uma perspectiva de saúde pública**. editado por Hajo Zeeb e Ferid Shannoun. – São Paulo, SP : 1ª Edição, 2016.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. **Manual Series**, p. 247, 2011.

ISINKAYE, M. O.; EMELUE, H. U. Natural radioactivity measurements and evaluation of radiological hazards in sediment of Oguta Lake, South East Nigeria. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 3, p. 459-469, 2015.

JOHNSON, C.; ARMSTRONG, H.; WILSON, W. H.; BIEGALSKI, S. R. Examination of radioargon production by cosmic neutron interactions. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 140, p. 123-129, 2015.

KAMAEV, Valery A.; MIKHNEV, Ilya P.; SALNIKOVA, Natalia A. Natural radionuclides as a source of background irradiation affecting people inside buildings. **Procedia engineering**, v. 150, p. 1663-1672, 2016.

KANG, Chang-Mo et al. Strong correlation among three biodosimetry techniques following exposures to ionizing radiation. **Genome integrity**, v. 7, 2016.

KIM, Si-Heon et al. Attributable risk of lung cancer deaths due to indoor radon exposure. **Annals of occupational and environmental medicine**, v. 28, n. 1, p. 8, 2016.

KIRSCH-VOLDERS, Micheline et al. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 177-184, 2011.

KRISHNASWAMI, S.; COCHRAN, J. K. Uranium-Thorium Radionuclides in Ocean Profiles. 2016.

Kusiak RA, Ritchie AC, Muller J, Springer J. 1993. Mortality from lung-cancer in Ontario uranium miners. **British Journal of Industrial Medicine** 50:920–928.

LAURIER, Dominique et al. An update of cancer mortality among the French cohort of uranium miners: extended follow-up and new source of data for causes of death. **European journal of epidemiology**, v. 19, n. 2, p. 139-146, 2004.

LOURENÇO, J. et al. Biomonitoring a human population inhabiting nearby a deactivated uranium mine. **Toxicology**, v. 305, p. 89-98, 2013.

LUCHS, Adriana; PANTALEÃO, Claudia. Apoptose e modelos in vivo para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno. **Einstein (São Paulo)**, v. 8, n. 4, p. 495-497, 2010.

MARGERIT, A.; LECOMTE-PRADINES, C.; SVENDSEN, C.; FRELON, S.; GOMEZ, E.; GILBIN, R. Nested interactions in the combined toxicity of uranium and cadmium to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 118, p. 139-148, 2015.

MAZZILLI, Barbara Paci; MÁDUAR, M. F.; CAMPOS, M. P. Radioatividade no meio ambiente e avaliação de impacto radiológico ambiental. **São Paulo: IPEN**, 2011.

MEENAKSHI, C.; MOHANKUMAR, Mary N. Synergistic effect of radon in blood cells of smokers—an in vitro study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 757, n. 1, p. 79-82, 2013.

MEENAKSHI, C.; SIVASUBRAMANIAN, K.; VENKATRAMAN, B. Nucleoplasmic bridges as a biomarker of DNA damage exposed to radon. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 814, p. 22-28, 2017.

MEENAKSHI, C.; VENKATRAMAN, B. Correlation between cytogenetic biomarkers obtained from DC and CBMN assays caused by low dose radon exposure in smokers. **International journal of radiation biology**, v. 95, n. 9, p. 1268-1275, 2019.

MENDES, Mariana Esposito. **Aplicação de técnicas citogenéticas em cenários complexos de exposição à radiação ionizante**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco

MENDES, Mariana Esposito. **Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em faixa gama**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

MOISEENKO, Vitali et al. Biological dosimetry to assess risks of health effects in victims of radiation accidents: Thirty years after Chernobyl. **Radiotherapy and Oncology**, v. 119, n. 1, p. 1-4, 2016.

MORAIS, Vinícius Henrique T. et al. Use of *Biomphalaria glabrata* as a bioindicator of groundwater quality under the influence of NORM. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 242, p. 106791, 2022.

MORENO DE SOUZA, Ebenezer. **Estratigrafia da seqüência clástica inferior (andares coniaciano-maastrichtiano inferior) da Bacia da Paraíba e suas implicações paleoestratigráficas**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

NIEMANTSVERDIET, Maarten et al. High and low LET radiation differentially induce normal tissue damage signals. **International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics**, v. 83, n. 4, p. 1291-1297, 2012.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v. 27, p. 185-200, 2013.

OSTLING, 650; JOHANSON, Karl J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PANDEY, A. K.; NAGPURE, N. S.; TRIVEDI, S. P.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B. Profenofos induced DNA damage in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, p. 209-214, 2011.

PAPP, B. et al. A new method for the determination of geophysical parameters by radon concentration measurements in bore-hole. **Journal of environmental radioactivity**, v. 99, n. 11, p. 1731-1735, 2008.

PAPP, B. et al. Soil radon and thoron studies near the mofettes at Harghita Bai (Romania) and their relation to the field location of fault zones. **Geofluids**, v. 10, n. 4, p. 586-593, 2010.

PAZ-Y-MIÑO, C SÁNCHEZ, ME; M ARÉVALO, MJ MUÑOZ, T WITTE. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology* 30 (2), 456-460.

PERNOT, Eileen et al. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 2, p. 258-286, 2012.

POUGET, J. P. et al. Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. **Radiation research**, v. 157, n. 5, p. 589-595, 2002.

RADFORD, Edward P.; RENARD, KG St Clair. Lung cancer in Swedish iron miners exposed to low doses of radon daughters. **New England Journal of Medicine**, v. 310, n. 23, p. 1485-1494, 1984.

RAWOJC, Kamila et al. Application of the micronucleus assay performed by different scorers in case of large-scale radiation accidents. **Nukleonika**, v. 60, 2015.

ŘEŘIČHA, Vladimír et al. Incidence of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma in Czech uranium miners: a case-cohort study. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 6, p. 818-822, 2006.

ROBERTSON, Aaron et al. The cellular and molecular carcinogenic effects of radon exposure: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 14024-14063, 2013.

ROJAS, E.; LORENZO, Y.; HAUG, K.; NICOLAISSEN, B.; VALVERDE, M. Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 386, 2014

SAMET JM, Pathak DR, MORGAN MV, Key CR, Valdivia AA, Lubin JH. 1991. Lung-cancer mortality and exposure to radon progeny in a cohort of New-Mexico underground uranium miners. **Health Physics** 61:745–752.

SANTOS JÚNIOR, J. A.; AMARAL, R. S.; MENEZES, R. S. C.; ÁLVAREZ, J. R. E.; SANTOS, J. M. N.; FERNÁNDEZ, Z. H.; BEZERRA, J. D.; SILVA, A. A.; DAMASCENA, K. F. R.; NETO, J. A. M. Influence of terrestrial radionuclides on environmental gamma exposure in a uranium deposit in Paraíba, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 154-159, 2017

SANTOS, T. O.; BONOTTO, D. M.  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  and hydrochemistry in the Bauru aquifer system, São José do Rio Preto (SP), **Brazil**. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 86, p. 109-117, 2014.

SCHUBAUER-BERIGAN, Mary K.; DANIELS, Robert D.; PINKERTON, Lynne E. Radon exposure and mortality among white and American Indian uranium miners: an update of the Colorado Plateau cohort. **American journal of epidemiology**, v. 169, n. 6, p. 718-730, 2009.

SINGH, P. D.; DE FREITAS PACHECO, J. A.; LANDABERRY, S. J. C. Spectrophotometric observations of the Comet Halley during the 1985–86 apparition. **Monthly Notices of the Royal Astronomical Society**, v. 235, n. 2, p. 457-464, 1988.

SINGH, Prabhjot et al. Radionuclide measurements along with exhalation study in subsoil of southeast Haryana, India. **Environmental Earth Sciences**, v. 76, n. 9, p. 332, 2017.

SINITSKY, Maxim Yu. The cytokinesis-block micronucleus assay on peripheral blood lymphocytes as a prospective biological test-system to estimate the influence of radon on the human organism: recent progress and future prospects. **Open Journal of Genetics**, v. 2014, 2014.

SMITH, Brian J.; ZHANG, Lixun; FIELD, R. William. Iowa radon leukaemia study: a hierarchical population risk model for spatially correlated exposure measured with error. **Statistics in medicine**, v. 26, n. 25, p. 4619-4642, 2007.

SPACOV, I. C. G. et al. External dosimetry in kaolin mines in the Seridó region of Northeast Brazil. **Cerâmica**, v. 64, n. 369, p. 133-140, 2018.

SZETO, Y. T.; BENZIE, I. F. F.; COLLINS, A. R.; CHOI, S. W.; CHENG, C. Y.; YOW, C. M. N.; TSE, M. M. Y. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 578, p. 371-381, 2005.

THIERENS, Hubert; VRAL, Anne. The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita**, v. 45, n. 3, p. 260-264, 2009.

- TICE, Raymond R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- TIRMARCHE, M. et al. Mortality of a cohort of French uranium miners exposed to relatively low radon concentrations. **British journal of cancer**, v. 67, n. 5, p. 1090-1097, 1993..
- TOMASEK, L. Czech miner studies of lung cancer risk from radon. **Journal of Radiological Protection**, v. 22, n. 3A, p. A107, 2002.
- TOMASEK, L. et al. Mortality in uranium miners in west Bohemia: a long-term cohort study. **Occupational and environmental medicine**, v. 51, n. 5, p. 308-315, 1994.
- TUCKER, James D. et al. Estimating the lowest detectable dose of ionizing radiation by the cytokinesis-block micronucleus assay. **Radiation research**, v. 180, n. 3, p. 284-291, 2013.
- VENGOSH, Avner; WEINTHAL, Erika. **Water Quality Impacts of the Energy-Water Nexus**. Cambridge University Press, 2022.
- VOGIN, Guillaume; FORAY, Nicolas. The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. **International journal of radiation biology**, v. 89, n. 1, p. 2-8, 2013.
- VRAL, Anne; FENECH, Michael; THIERENS, Hubert. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 11-17, 2011.
- WALCZAK, Katarzyna et al. Residential exposure to radon and levels of histone  $\gamma$ H2AX and DNA damage in peripheral blood lymphocytes of residents of Kowary city regions (Poland). **Chemosphere**, v. 247, p. 125748, 2020.
- Woodward A, Roder D, McMichael AJ, Crouch P, Mylvaganam A. 1991. Radon daughter exposures at the radium hill uranium-mine and lung-cancer rates among former workers, 1952–87. **Cancer Causes and Control** 2:213–220.
- XIAO, Changyan et al. Research progress on biodosimeters of ionizing radiation damage. **Radiation Medicine and Protection**, v. 1, n. 3, p. 127-132, 2020.
- XUAN, Xiang-Zhen et al. A cohort study in southern China of tin miners exposed to radon and radon decay products. **Health physics**, v. 64, n. 2, p. 120-131, 1993.

## ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE ANAMNESE

### I - DADOS PESSOAIS

1.2 Nº do Voluntário: \_\_\_\_\_

1.3 Sexo: M [ 0 ] F [ 1 ] 1.4 Data de Nascimento \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ 1.5 Data de hoje \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

1.6 Estado civil:

Solteiro[ 0 ]; Casado[ 1 ]; Viúvo[ 2 ]; Divorciado[ 3 ]; Separado[ 4 ];  
Outros [ 5 ]

1.7 Cargo: \_\_\_\_\_ Função: \_\_\_\_\_

1.8 Grau de Instrução (escolaridade):

- [ 1 ] não estudou / Primário Incompleto
- [ 2 ] primário Completo / Ginásial Incompleto
- [ 3 ] ginásio Completo / Colegial Incompleto
- [ 4 ] colegial Completo / Superior Incompleto
- [ 5 ] superior Completo / Pós-Graduação Incompleta
- [ 6 ] pós-Graduação Completa

1.9 Indique nos espaços abaixo a QUANTIDADE de itens que existem em sua residência:

Quantos	Quantos	Quantos
[ ] automóvel	[ ] rádio	[ ] máquina de lavar roupa
[ ] banheiro	[ ] videocassete	[ ] empregada mensalista
[ ] aspirador de pó	[ ] geladeira	[ ] TV em cores

1. Total de Pessoas na Família: [ ]

### II - INDICADORES GERAIS DE SAÚDE

2.1 Com relação ao fumo, marque a resposta apropriada para o seu caso:

- |  |   |
|--|---|
| [ 1 ] nunca fumei<br>dia                         | [ 5 ] fumo de dez a vinte cigarros por<br>dia |
| [ 2 ] parei de fumar há mais de dois anos<br>dia | [ 6 ] fumo mais que vinte cigarros por<br>dia |
| [ 3 ] parei de fumar a menos de dois anos        | [ 7 ] só fumo charuto ou cachimbo             |
| [ 4 ] fumo menos de dez cigarros por dia         |   |

2.2 Quantos "drinques" você toma POR SEMANA: (um drinque = 1/2 garrafa de cerveja, um copo de vinho ou uma dose de destilado)

**ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE ANAMNESE (CONTINUAÇÃO)**

## ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE ANAMNESE (CONTINUAÇÃO)

Possui na família PAI, MÃE ou IRMÃOS que apresentam ou apresentaram:

[ 1 ] Angina, Infarto ou morte súbita antes dos 50 anos [ ]

[ 2 ] Angina, Infarto ou morte súbita após os 50 anos [ ] [ 3 ] Diabetes [ ]

[ 4 ] Pressão alta ou AVC [ ] [ 5 ] Não sabe [6]

Nenhum

[7]Outros: \_\_\_\_\_

O Sr<sup>o</sup>(a) foi submetido a qualquer procedimento envolvendo o uso de radiação nos últimos seis meses? Sim [1] Não [2]

O Sr<sup>o</sup>(a) recebeu qualquer tipo de vacinação nos últimos seis meses? Sim [1] Não [2]

Qual? \_\_\_\_\_

### V - QUESTIONÁRIO DE ESTRESSE FISIOLÓGICO

Os sintomas físicos do estresse são excelentes indicadores numa avaliação. O seguinte questionário nos ajudará a ter uma idéia da severidade do estresse que você está experimentando na sua vida diária, gerando alterações no funcionamento normal de seu organismo. Responda cada número entre 0 e 5, usando a escala abaixo:

0 = nunca 1 = uma a 2 vezes ao ano

2 = quase todos os meses 3 = quase todas as semanas

4 = uma ou mais vezes por semana 5 = diariamente

SINTOMAS CARDIOVASCULAR	SINTOMAS DA PELE
___ taquicardia	___ acne
___ batidas vigorosas e descompassadas do coração	___ caspa
___ mãos suadas e frias	___ transpiração
___ dores ou pontadas na cabeça	___ ressecamento excessivo da pele ou cabelo
SINTOMAS RESPIRATÓRIOS	SINTOMAS IMUNOLÓGICOS
___ respiração rápida ou irregular, ou curta	___ coceira/ardência
___ falta de ar	___ resfriado
___ ataque de asma	___ gripes fortes
___ dificuldade de falar, por pouco controle da respiração	___ rachaduras na pele
SINTOMAS GASTROINTESTINAIS	SINTOMAS METABÓLICOS
___ indisposição estomacal, náuseas e vômitos	___ aumento do apetite
___ constipação	___ aumento da ansiedade por fumo e doces
___ diarreia	___ preocupação generalizada e dificuldade para dormir
___ dor abdominal aguda	

**ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE ANAMNESE (CONTINUAÇÃO)**

SINTOMAS MUSCULARES
<input type="checkbox"/> dor de cabeça (dor continua)
<input type="checkbox"/> tremores musculares e das mãos
<input type="checkbox"/> artrites

## ANEXO B – PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL OTÁVIO DE  
FREITAS/ SES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Saúde da população em área densamente habitada sob influência de fosforito uranífero. 1. O fato do radônio-222

**Pesquisador:** MARIANA LUIZA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 55704016.6.0000.5200

**Instituição Proponente:** SECRETARIA DE SAUDE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.533.244

#### Apresentação do Projeto:

Saúde da população em área densamente habitada sob influência de fosforito uranífero. 1. O fato do radônio-222

#### Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar medidas da concentração de atividade do Rn-222 nas matrizes solo, ar e água com aspecto da saúde humana, além da análise de cromossomos dicêntricos para biomonitoração in vitro na região fósforo urinífera.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Longa duração
- A amostra necessita de um elevado número de indivíduos acompanhados

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Permite o cálculo de incidência

O estudo pode ser planejado

Pode evitar associação com outras doenças

**Endereço:** Rua Aprígio Guimarães S/N

**Bairro:** Tejupió

**CEP:** 50.920-640

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)3182-8578

**Fax:** (81)3182-8632

**E-mail:** cephof@yahoo.com.br

## HOSPITAL OTÁVIO DE FREITAS/ SES



Continuação do Parecer: 1.533.244

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Encontram-se de acordo com o que propõe este comitê.

**Recomendações:**

Que a pesquisa em tela seja desenvolvida de acordo com o que propõe a mesma.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_701535.pdf	28/04/2016 10:50:48		Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	28/04/2016 10:48:30	MARIANA LUIZA	Aceito
Outros	cartanuencia.png	19/04/2016 14:26:15	MARIANA LUIZA	Aceito
Outros	TCLEANALFABETO.docx	19/04/2016 14:24:33	MARIANA LUIZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEALFABETIZADO.docx	19/04/2016 14:23:14	MARIANA LUIZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMariana.doc	19/04/2016 14:22:09	MARIANA LUIZA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 06 de Maio de 2016

---

**Assinado por:**  
**José Alexandre de Andrade Ferreira**  
**(Coordenador)**

<b>Endereço:</b> Rua Aprígio Guimarães S/N		<b>CEP:</b> 50.920-640
<b>Bairro:</b> Tejipió		
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE	
<b>Telefone:</b> (81)3182-8578	<b>Fax:</b> (81)3182-8632	<b>E-mail:</b> cephof@yahoo.com.br

## **ANEXO C – TERMO REDUZIDO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (ANÁLISE DE DANOS CITOGENÉTICOS EM LINFÓCITOS HUMANOS EXPOSTOS AO RN<sup>222</sup>), que está sob a responsabilidade do (a) pesquisadora Laís Melo da Silva, Departamento de Energia Nuclear – Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Luiz Freire, 1000, CDU, 50.740-545, Recife/PE - Fone: (81) 98774-2784/ E-mail: lais.msilva@ufpe.br.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores:

Orientação de Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo, Telefones para contato: (81) 99139-4775 e e-mail: amdemelo@hotmail.com.

e coorientação de: Fabiana Farias de Lima Guimarães, Telefone: (81) 3797-8024, e-mail: fflima@cnen.gov.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

Este estudo tem por objetivo obter um parâmetro epidemiológico de indivíduos expostos a doses acima do basal de radiação ionizante de forma crônica, que habitam na Região Urano Fosfática do Nordeste brasileiro, e fazem uso de águas de fontes naturais não tratadas contaminadas com radionuclídeos. Por ser um agente genotóxico, a exposição crônica a radiação pode ter consequências a saúde do indivíduo com efeitos imediatos ou tardios, sendo um deles o câncer. Essa pesquisa é de extrema importância para avaliar a prevalência dos biomarcadores que indicam a necessidade de atenção especial a saúde e melhoria na qualidade da água.

Este projeto poderá ser tomado como base para trabalhos futuros de biomonitoramento ecológico, coletando novos dados, ampliando o número amostral, tornando esse tipo de estudo direto na população exposta mais consolidado e recorrente.

Aspira-se que os resultados impactem em políticas públicas de melhoria para os moradores, em trabalhos de pesquisa que visem um tratamento viável e de qualidade da água nessas fontes domésticas, bem como servir de base para ações de conscientização para os usuários expostos

Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer amostras de sangue (30 ml), por punção venosa, em tubos de vacutainers contendo EDTA, após assinatura deste termo. Seu material será usado exclusivamente para efeito desta pesquisa. O(a) Sr(a). também responderá

## **ANEXO C – TERMO REDUZIDO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTINUAÇÃO)**

um questionário para verificação do seu estado geral de saúde, apontando se nos últimos seis meses antes da coleta houve alguma exposição à radiação terapêutica ou raios X diagnóstico; aplicação de vacinas; ou consumo de drogas ilícitas. Essas informações são necessárias, pois os fatores citados podem alterar os resultados. Vale ressaltar que esse questionário será respondido de forma individual e particular para evitar qualquer tipo de constrangimento.

Os riscos inerentes à participação podem ser: (1) o constrangimento em não saber ou não querer responder a algum item do questionário; (2) durante a coleta, que obedecerá aos requisitos de segurança e assepsia, os voluntários poderão sentir uma ardência local e, eventualmente, após coleta, poderá se formar um hematoma, que desaparecerá em poucos dias. Esses riscos podem ser minimizados (1) realizando o questionário de forma individual e privada; e (2) utilizando compressa de gelo logo após a coleta. Há também a possibilidade de desistência de participação na pesquisa a qualquer momento. Ressaltamos que, em momento algum, o(a) senhor(a) será exposto(a) a quaisquer fontes radioativas. Quanto aos benefícios, haverá o direto e os indiretos. O benefício direto ao voluntário será de fornecer a informação quanto aos níveis espontâneos alterações no DNA que o mesmo possui. Essa informação será enviada pós análise aos doadores por meio de um documento/carta padrão via correio ou e-mail. No caso dos indiretos, os dados obtidos serão base para estudos maiores e recorrentes, que influenciaram em políticas públicas para a melhoria da vida de diversas pessoas.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, tais como os questionários e os resultados das análises citogenéticas, ficarão armazenados em pastas de arquivos do próprio centro de pesquisa - CRCN-NE/CNEN, sob a responsabilidade da pesquisadora Fabiana Farias de Lima Guimarães no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 - e-mail: cepccs@ufpe.br).

---

(assinatura do pesquisador)

## **ANEXO C – TERMO REDUZIDO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTINUAÇÃO)**

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo ANÁLISE DE DANOS CITOGENÉTICOS EM LINFÓCITOS HUMANOS EXPOSTOS AO RN<sup>222</sup>, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:

Assinatura:

Nome:

Assinatura: