



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

LUÍZA ARAÚJO DA COSTA XAVIER

**INFLUÊNCIA DO RADÔNIO E PARTÍCULAS ALFA NA
OXIDAÇÃO DO GENOMA E METILAÇÃO DAS
SEQUÊNCIAS LINE-1**

**NATAL - RN
MAIO 2022**

LUÍZA ARAÚJO DA COSTA XAVIER

INFLUÊNCIA DO RADÔNIO E PARTÍCULAS ALFA NA OXIDAÇÃO DO
GENOMA E METILAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS LINE-1

Tese apresentada ao Departamento
de Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte como
requisito parcial para obtenção do
título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Viviane Souza do
Amaral

Co-orientador: Dr. Edouard Azzam

NATAL - RN
MAIO 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Xavier, Luíza Araújo da Costa.

Influência do radônio e partículas alfa na oxidação do genoma e metilação das sequências LINE-1 / Luíza Araújo da Costa Xavier. - 2022.

81 f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. Natal/RN, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Souza do Amaral.

Coorientador: Prof. Dr. Edouard Azzam.

1. Radiação natural - Tese. 2. Radiobiologia - Tese. 3. Epigenética - Tese. I. Amaral, Viviane Souza do. II. Azzam, Edouard. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 613.648

LUÍZA ARAÚJO DA COSTA XAVIER

**Influência do radônio e partículas alfa na oxidação do genoma e metilação das
sequências LINE-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em: 10/05/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cláudia Rohde
Examinadora Externa à Instituição – UFPE

Prof. Dr. Julio Alejandro Navoni
Examinadora Externa à Instituição – IFRN

Prof^a. Dr^a. Marialva Sinigaglia
Examinadora Externa à Instituição – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros
Examinadora Interna ao Programa – UFRN

Prof^a. Dr^a. Viviane Souza do Amaral
Orientadora – UFRN



Emitido em 10/05/2022

FICHA DE AVALIAÇÃO Nº 2/2022 - BIOQ (17.32)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 17/05/2022 14:45)
SÍLVIA REGINA BATISTUZZO DE MEDEIROS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBG/CB (17.09)
Matricula: 1199127

(Assinado digitalmente em 17/05/2022 09:45)
VIVIANE SOUZA DO AMARAL
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBG/CB (17.09)
Matricula: 1674709

(Assinado digitalmente em 18/05/2022 08:25)
JULIO ALEJANDRO NAVONI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 707.819.324-59

(Assinado digitalmente em 17/05/2022 10:32)
MARILVA SINIGAGLIA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 609.016.910-20

(Assinado digitalmente em 17/05/2022 11:35)
CLAUDIA ROHDE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 487.552.810-87

(Assinado digitalmente em 17/05/2022 15:10)
LUIZA ARAÚJO DA COSTA XAVIER
DISCENTE
Matricula: 20171018799

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: 2
, ano: 2022, tipo: FICHA DE AVALIAÇÃO, data de emissão: 16/05/2022 e o código de verificação: 84639c3272

RESUMO

O presente trabalho avaliou os efeitos genotóxicos e epigenéticos em indivíduos expostos naturalmente ao radônio (Rn) no interior de residências em Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte, Brasil. Também foi investigado um efeito epigenético em ensaios *in vitro* com cultura de células expostas a diferentes doses de partículas alfa. Para tanto, foi conduzido um estudo observacional do tipo caso-controle com 224 indivíduos de Lajes Pintadas (grupo LP) e 65 indivíduos da cidade de Natal (grupo controle para o Rn). Foram coletadas amostras de sangue e urina dos participantes de ambas as cidades para realizar os seguintes ensaios: (a) testes bioquímicos de análises clínicas; (b) quantificação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG); (c) determinação do polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1*; (d) quantificação de chumbo no sangue; (e) quantificação de citosinas metiladas (Cm) das sequências LINE-1 como bioindicadoras de metilação global do genoma das células sanguíneas dos participantes; além disso, todos os indivíduos recrutados foram entrevistados com um questionário a fim de coletar informações sociodemográficas, exposições ambientais e ocupacionais, estilo de vida e histórico de saúde geral. Como também foram feitas medições da concentração de Rn no interior das residências dos participantes de ambos os grupos. Nos experimentos *in vitro*, fibroblastos de pulmão humano foram expostos a 0 (controle), 0,25, 0,5 e 1 Gy de partículas alfa e logo em seguida, as células foram congeladas até o momento de analisar a %Cm na região promotora das sequências LINE-1. Este ensaio foi repetido para a progênie das células irradiadas. Considerando os resultados das análises *in vivo*, foi observado que os indivíduos expostos aos altos níveis de Rn interior apresentaram concentrações de 8-OHdG aproximadamente 1,5 vezes maiores do que os expostos a baixos níveis deste gás (valor-p < 0,01). Pessoas heterozigotas para o polimorfismo em *hOGG1* tiveram concentrações significativamente menores de 8-OHdG em comparação com os homozigotos para o alelo selvagem, considerando a exposição aos mais altos níveis de Rn (a partir de 145 Bq/m³; valor-p < 0,05). A concentração média de chumbo sanguíneo entre os grupos controle e LP não apresentou diferença significativa: 1,15 ± 0,91 µg/dL e 1,66 ± 1,55 µg/dL, respectivamente, sendo esses valores abaixo do limite de 5 µg/dL estabelecido pelo Centro de Controle de Prevenção de Doenças dos Estados Unidos. A análise epigenética apontou que houve diferença significativa entre as médias de Cm em LINE-1 dos grupos – 50,23% ± 3,44 para o controle e 51,87% ± 2,96 para o grupo LP (valor-p < 0,001). Além disso, os níveis de Rn interior, as concentrações sanguíneas de chumbo e o sexo dos indivíduos foram fatores que influenciaram significativamente a média da %Cm das sequências LINE-1 dos participantes. Nos ensaios *in vitro*, foi observado que não houve diferença significativa entre as médias de %Cm segundo as distintas doses de partículas alfa aplicadas nas células. Pode ser concluído que elevados níveis de radiação ionizante natural provocam instabilidade no genoma por vias oxidativas e epigenéticas mesmo em células passageiras não-irradiadas.

Palavras-chave: epigenética; radiação natural; radiobiologia; saúde humana; genotoxicidade ambiental.

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the genotoxic and epigenetic effects in individuals exposed to natural concentrations of radon (Rn) inside dwellings from Lajes Pintadas city, Rio Grande do Norte state, Brasil. Epigenetic effects were also investigated in assays with cell cultures exposed to different doses of alpha particles. For that purpose, an observational case-control study was conducted with 224 individuals from Lajes Pintadas (LP group) and 66 individuals from Natal city (control group). Blood and urine samples were collected from participants of both cities to perform the following tests: (a) biochemical clinical analysis tests; (b) quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in urine; (c) determination of the Ser326Cys polymorphism in *hOGG1* gene; (d) quantification of lead in blood; (e) quantification of methylated cytosines (mC) in LINE-1 sequences as bioindicators of global genome methylation of the participant's blood cells. In addition, all recruited individuals were interviewed with a questionnaire to collect sociodemographic information, environmental and occupational exposures, lifestyle and general health history. Besides, measurements of Rn concentrations were collected inside dwellings of participants from both groups. About the *in vitro* experiments, human lung fibroblasts were exposed to 0 (control), 0.25, 0.5 and 1 Gy of alpha particles and their %mC in the promoter region of the LINE-1 sequences were determined. This assay was repeated for the progeny of irradiated cells. It was observed that individuals exposed to high indoor Rn levels had 8-OHdG concentrations approximately 1.5 times higher than those exposed to low levels of this gas (p-value < 0.01). People heterozygous for the *hOGG1* polymorphism had significantly lower concentrations of 8-OHdG compared to those homozygous for the wild-type allele, considering exposure to the highest Rn levels (from 145 Bq/m³ upwards; p-value < 0.05). The mean concentrations of blood lead between the control and LP groups showed no significant difference: 1.15 ± 0.91 µg/dL and 1.66 ± 1.55 µg/dL, respectively, and these values were below the limit established by the Center Disease Prevention Control (5 µg/dL). In epigenetics, there was a significant difference between the means of %mC in LINE-1 of the groups – 50.23% ± 3.44 for control and 51.87% ± 2.96 for the LP group (p-value < 0.001). Indoor Rn levels, blood lead concentrations and the individuals' sex were factors that significantly influenced the mean %mC of LINE-1 sequences of the participants. For the *in vitro* assays, there was no significant difference between the means of %mC among the different doses of alpha particles applied to the cells. It can be concluded that high levels of natural ionizing radiation can cause genome instability through oxidative and epigenetic pathways even in passenger non-irradiated cells from the human body.

Keywords: epigenetic, background radiation, radiobiology, human health, environmental genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espectro eletromagnético dos tipos de radiação existentes. Fonte: adaptada de (MINI PHYSICS, 2016).....12
- Figura 2.** Proporção das fontes de exposição à radiação ionizante segundo suas contribuições para uma dose anual. Os valores se alteram ao considerar a passagem do tempo – 1987 e 2009, respectivamente, nos painéis A e B. Fonte: adaptada de (NCRP, 2017).....13
- Figura 3.** Efeitos celulares da radiação ionizante. Fonte: adaptada de (AZZAM *et al.*, 2012).....15
- Figura 4.** Diferenças entre o padrão de lesões na matéria, representada como o ADN de uma célula eucariótica, segundo o tipo de transferência linear de energia (TLE) da fonte de radiação ionizante (RI). (A) Radiação de alta-TLE provocando lesões agrupadas em maior quantidade quando comparadas com (B), radiação de baixa-TLE que causa lesões espaçadas e em menor quantidade. Fonte: adaptada de (MOORE; STANLEY; GOODARZI, 2014).....16
- Figura 5.** Reação simplificada de formação da 8-oxoguanosina. Imagem adaptada de (DELANEY *et al.*, 2012).....17
- Figura 6.** Replicação do ADN contendo 8-oxoguanosina (8-oxoG) em uma das fitas. A guanosina oxidada pode ser pareada com adenina durante a fase S do ciclo celular. Em replicações posteriores, esta adenina será pareada com timina, fixando a mutação de G:C para T:A no genoma de uma das células-filha. Imagem adaptada de (D'AUGUSTIN *et al.*, 2020).....18
- Figura 7.** Representação esquemática da cadeia de decaimento do urânio. Em cada círculo encontra-se descrito, de cima para baixo, a massa atômica, o símbolo do elemento e seu tempo de meia-vida. Em cima de cada seta é indicado o tipo de partícula (alfa, beta ou gama) emitida. Fonte: adaptada de (WNA, 2020).....22

Figura 8. Inalação do gás radônio pelo trato respiratório humano, ressaltando a passagem de uma partícula alfa através de uma célula endotelial dos alvéolos pulmonares. Fonte: figura própria da autora Luíza Xavier, feita com recursos do site Biorender.....23

Figura 9. Mapa da localização geográfica de Lajes Pintadas. Na borda superior esquerda está representado o mapa do Brasil com destaque em preto no estado do Rio Grande do Norte, o qual encontra-se ampliado com a microrregião da Borborema Potiguar em cor cinza. O município de Lajes Pintadas distingue-se dos demais pela cor preta. ST, São Tomé. SC, Santa Cruz. CR, Campo Redondo. N, Natal, a capital do estado. Fonte: imagem própria de Luíza Xavier, feita com mapas disponíveis na internet.....25

Figura 10. Níveis de radônio medido no interior de residências localizadas em área com baixos (controle) e altos (LP) níveis deste elemento. A linha azul em 100 Bq/m³ representa o limite de exposição a este gás estabelecido pela Organização Mundial da Saúde. As barras representam o erro padrão com intervalo de confiança 95%.....40

Figura 11. Concentração média de 8-oxoguanosina (ng/mL) de amostras de urina dos grupos de baixo (controle) e alto (LP) níveis de Rn interior. As barras representam o erro padrão com intervalo de confiança 95%.....41

Figura 12. Gráfico demonstrando a relação entre as concentrações de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina urinária (ng/mL) (eixo y) e polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* (eixo x) agrupados segundo os níveis de radônio interior (dividido em quartis, Q1, Q2, Q3 e Q4). Cada ponto representa a média e a barra representa o erro padrão da média.....44

Figura 13. Gráfico de caixa representando a distribuição da porcentagem de citosinas metiladas das sequências LINE-1 dos grupos controle (cidade com baixos níveis de Rn interior, caixa da esquerda) e LP (cidade com altos níveis de Rn interior, caixa da direita).....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados sociodemográficos e do estilo de vida dos residentes em Lajes Pintadas (grupo LP) e Natal (grupo controle), Brasil.....	37
Tabela 2. Resultados de testes hematológicos e bioquímicos dos indivíduos recrutados.....	39
Tabela 3. Estatística descritiva para o gás radônio (Bq/m ³) medido no interior de residências em duas cidades distintas do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.....	40
Tabela 4. Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo Ser326Cys no gene <i>hOGG1</i>	42
Tabela 5. Influência do gás radônio e polimorfismo no gene <i>hOGG1</i> nas concentrações de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina urinária em habitantes de áreas de baixa e média-alta radiação natural, a partir do modelo de regressão linear generalizada.....	42
Tabela 6. Níveis de metilação das sequências LINE-1 segundo o sexo dos participantes.....	46
Tabela 7. Parâmetros de influência de algumas variáveis sobre a metilação das sequências genéticas LINE-1, a partir da regressão linear generalizada.....	47
Tabela 8. Metilação das sequências LINE-1 em fibroblastos de pulmão humano expostos a partículas alfa.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-hidroxi-2'-deoxiguanosina	8-OHdG
Adenina	A
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido etilenodiamino tetra-acético	EDTA
Ácido ribonucleico	ARN
Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana	EPA
Agência Internacional de Pesquisas em Câncer	IARC
Alfa	α
Análise de variância	ANOVA
Beta	β
Chumbo	Pb
Cisteína	Cys
Citosina	C
Citosina – fosfato – guanina	CfG
Citosina metilada no carbono 5'	5-mC
Contagem de hemoglobina corpuscular média	CHCM
Elementos nucleares longos e interestaçados 1	LINE-1, L1
Gama	γ
Gene humano 8-oxoguanina ADN glicosilase	<i>hOGG1</i>
Gray	Gy
Guanina	G
Hemoglobina corpuscular média	HCM
Índice de anisocitose	RDW
Instituto Nacional de Câncer	INCA
Intervalo de confiança	IC
Meio essencial mínimo alfa	MEM α
Organização Mundial de Saúde	OMS
Pares de base	pb
Porcentagem de citosinas metiladas	%Cm
Radiação ionizante	RI
Radônio-222	Rn
Reação em cadeia da polimerase	RCP

Região não traduzida na extremidade 5'	RNT-5'
Serina	Ser
Sievert	Sv
Timina	T
Transferência linear de energia	TLE
Universidade Federal do Rio Grande do Norte	UFRN
Volume corpuscular médio	VCM

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Conceitos gerais sobre radiação e Radiobiologia	15
1.2. 8-Oxoguanosina: biomarcadora de danos no ADN	20
1.3. Metilação do ADN e Elementos repetitivos do genoma	22
1.4. O radônio e sua relevância para a saúde humana.....	24
1.5. Um cenário particular de radioatividade natural no nordeste brasileiro	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Amostragem.....	32
3.2. Quantificação de radônio interior	33
3.3. Quantificação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina urinária.....	33
3.4. Extração de ADN	34
3.5. Determinação do polimorfismo em <i>hOGG1</i>	34
3.6. Metilação das sequências LINE-1	35
3.7. Medida de chumbo sanguíneo	36
3.8. Experimento <i>in vitro</i>	36
3.8.1. Cultura de células	36
3.8.2. Irradiação de partículas α	37
3.8.3. Metilação das sequências LINE-1	38
3.9. Análises estatísticas.....	38
4. RESULTADOS.....	40

4.1. Caracterização da amostra de indivíduos	40
4.2. Medição de Rn interior	43
4.3. Quantificação de 8-OHdG urinária e avaliação do polimorfismo em <i>hOGG1</i>	44
4.4. Análise de citosinas metiladas em LINE-1 e de chumbo sanguíneo...	47
4.5. Metilação de LINE-1 das células expostas a partículas α <i>in vitro</i>	50
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A.....	77
ANEXO A	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conceitos gerais sobre radiação e Radiobiologia

Radiação é energia sendo propagada na forma de ondas eletromagnéticas ou partículas (Figura 1). A luz visível, micro-ondas, sinais de transmissão para televisão e rádio são exemplos de radiação não-ionizante, do tipo que não possui a capacidade de interagir com a matéria em nível atômico. Já a radiação ionizante, que apresenta alta frequência e menor comprimento de onda, é capaz de ejetar elétrons de átomos-alvos quando interage com a matéria, transformando-os em íons (WNA, 2021).

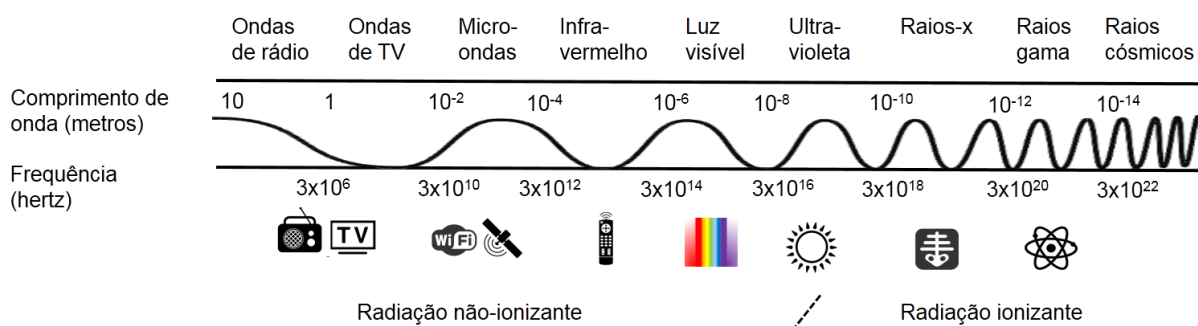


Figura 1. Espectro eletromagnético dos tipos de radiação existentes. Os valores de comprimento de onda e frequência são aproximados. Fonte: adaptada de (MINI PHYSICS, 2016).

Analisando a Figura 1, percebe-se que a exposição dos seres humanos à radiação é um evento ubíquo, a partir de fontes naturais, como a radiação cósmica e solar (ultravioleta), ou pela própria ação antrópica, como aparelhos eletrônicos, aplicações médicas de diagnóstico (raios-x, tomografia computadorizada) e atividades industriais (mineração), por exemplo. A maior fonte de exposição à radiação ionizante pela população é proveniente do meio ambiente (cerca de 50%), e o segundo lugar é ocupado pela exposição a partir de procedimentos médicos, os quais aumentaram consideravelmente nas últimas décadas, sendo os responsáveis por cerca de 48% da exposição anual na população norte-americana (Figura 2) (EPA, 2018).

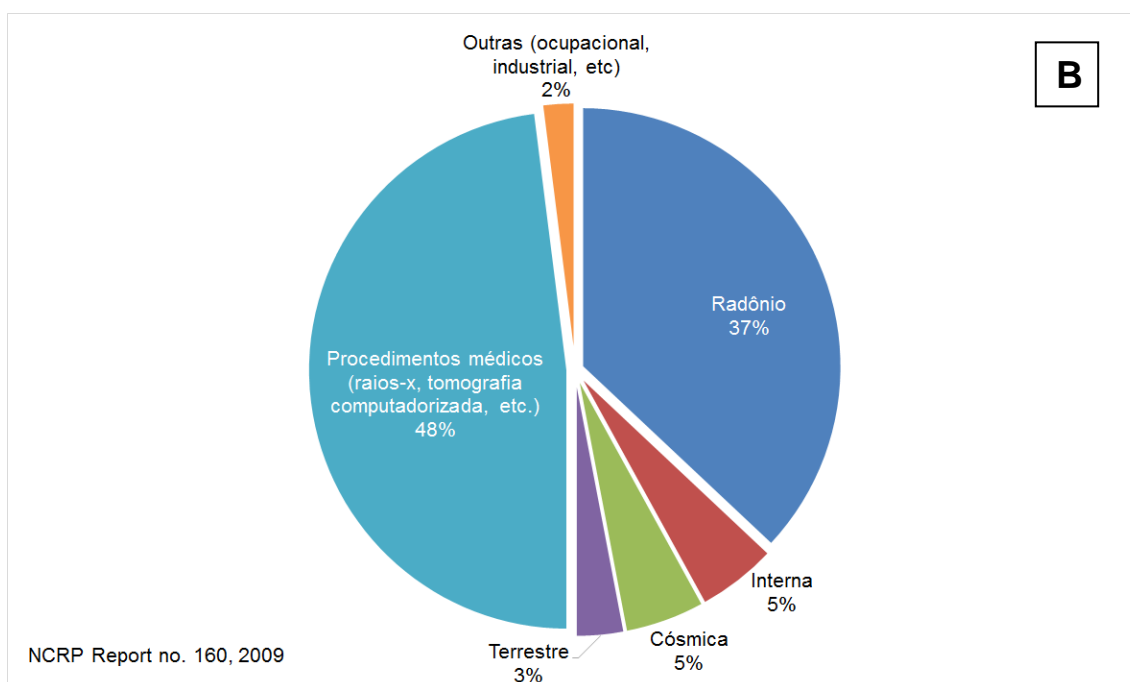
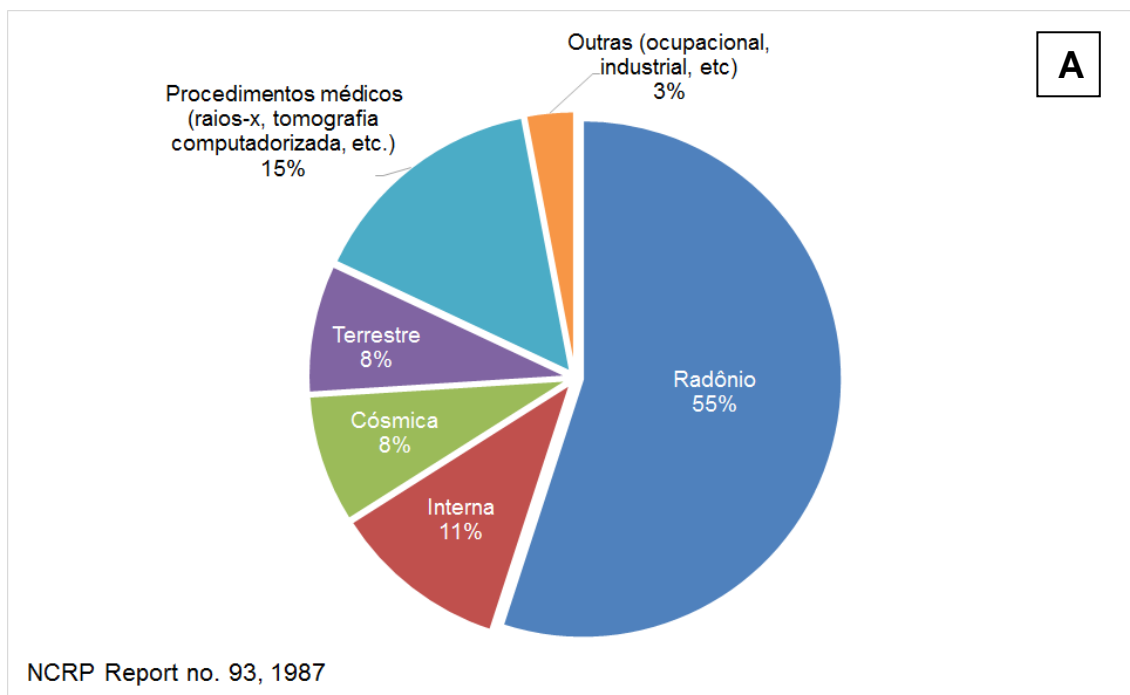


Figura 2. Proporção das fontes de exposição à radiação ionizante segundo suas contribuições para uma dose anual na população norte-americana. Os valores se alteram ao considerar a passagem do tempo – 1987 e 2009, respectivamente, nos painéis A e B. Fonte: adaptada de (NCRP, 2017).

A radiação ionizante (RI) natural, ou radiação de fundo, é transmitida por elementos químicos existentes no solo, água ou ar que possuem um núcleo atômico pesado e instável, isto é, que possuem excesso de partículas ou de cargas, as quais são liberadas para que a estabilidade seja alcançada. Portanto, elementos com estas propriedades – como o urânio, rádio, polônio, entre outros

– foram denominados elementos radioativos ou radionuclídeos, e a atividade característica de emitir radiação pode ser chamada de radioatividade (L'ANNUNZIATA, 2016).

Cada vez que um elemento emite radiação, ocorre uma variação do número de prótons no núcleo, conseqüentemente, transformando-o em outro elemento de propriedades distintas. Esta transformação é conhecida como decaimento radioativo e acontece a uma frequência característica para cada elemento. Logo, para acompanhar a duração de cada subproduto gerado em decaimentos sucessivos (cadeia de decaimento), utiliza-se uma medida padrão denominada tempo de meia-vida, conceituado como o tempo necessário para a atividade radioativa de um radionuclídeo ser reduzida à metade da atividade inicial. A atividade de um material radioativo pode ser expressa pela razão entre o número médio de transformações nucleares espontâneas e o intervalo de tempo decorrido, sendo medida pela unidade Becquerel (Bq), na qual o tempo é medido em segundos (TAUHATA *et al.*, 2014).

Em relação aos tipos de RI emitidas pelos radionuclídeos, podem ser destacadas as partículas alfa (α), beta (β) e os raios gama (γ). A partícula α é carregada positivamente (+2), já que é composta por dois prótons e dois nêutrons, podendo ser considerada um núcleo de hélio. Comparada com os outros tipos de RI, as partículas α tem maior energia e menor poder de penetração na matéria. A radiação β ocorre quando (I) o núcleo com excesso de nêutrons transforma um nêutron em próton mais um elétron, o qual é emitido na denominada emissão β^- ; ou (II) o núcleo com excesso de cargas positivas transforma um próton em nêutron, emitindo um pósitron, resultando na emissão β^+ . Já os raios γ são ondas eletromagnéticas excedentes liberadas pelo núcleo quando ele ainda se encontra em estado de excitação, mesmo após o decaimento α ou β , e precisa atingir o estado fundamental (L'ANNUNZIATA, 2016).

A energia transferida das partículas ionizantes nem sempre é totalmente absorvida pela matéria-alvo, devido à diversidade de modos de interação e à natureza do material. Logo, pode ser estabelecida uma razão entre a energia absorvida, ou seja, a energia depositada pela radiação em um determinado ponto do alvo, e a massa do volume do material atingido. Esta relação é a definição de Dose Absorvida, cuja unidade de medida é o J/Kg ou Gray (Gy).

Para a interação da RI com amostras biológicas vivas, utiliza-se a grandeza Equivalente de Dose (ou como também é conhecida, Dose Equivalente), pois esta é igual à dose absorvida multiplicada por um fator de qualidade Q, o qual constitui um valor adimensional simplificado que representa os diferentes tipos de radiação na indução de um mesmo efeito biológico; sua unidade de medida também é o J/Kg, mas, neste caso, utiliza-se a denominação *Sievert* (Sv) (REISZ *et al.*, 2014; TAUHATA *et al.*, 2014).

Já a fração de energia absorvida pelas células do corpo é capaz de agir diretamente quebrando ligações químicas das biomoléculas. Ela pode também agir indiretamente por meio da radiólise da água, evento que acaba gerando espécies químicas reativas, as quais por sua vez podem oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Figura 3). Portanto, estas ações em conjunto provocam alterações bioquímicas que iniciam uma série de cascatas de sinalizações moleculares a fim de remediar esses danos, ou culminar em alterações fisiológicas permanentes, podendo levar à morte celular (AZZAM *et al.*, 2012; REISZ *et al.*, 2014).

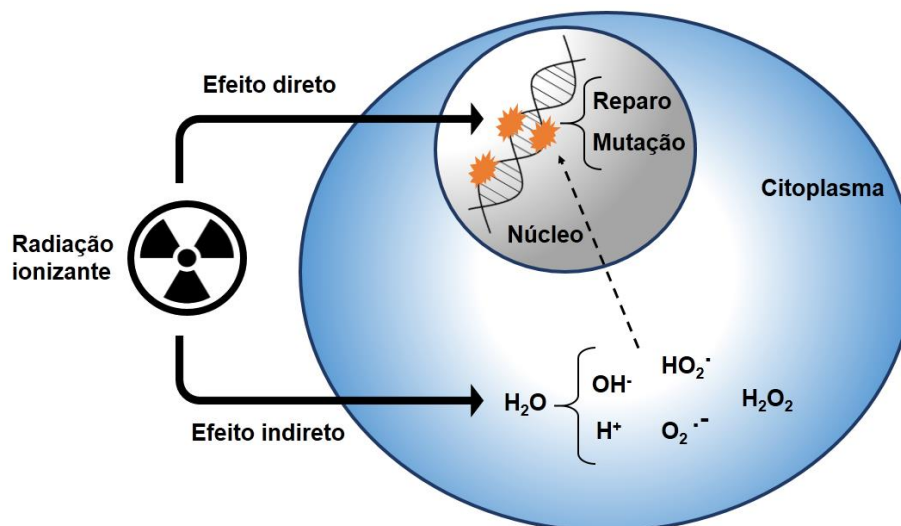


Figura 3. Efeitos celulares da radiação ionizante. Fonte: adaptada de (AZZAM *et al.*, 2012).

Quando se considera a energia localmente transmitida para um meio por uma partícula radioativa ao longo de uma determinada distância, tem-se uma propriedade denominada transferência linear de energia (TLE), a qual pode ser medida em eV/ μ M. Esta relação indica que uma radiação com certa energia e curto alcance em um meio irá gerar elevados valores de TLE em comparação

com radiações de mesma energia, mas com longos alcances no mesmo meio. A seguinte generalização pode ser feita em relação aos tipos de radiação e níveis decrescentes de TLE: partículas α > partículas β > raios γ (L'ANNUNZIATA, 2016). Logo, a radiação percorre uma determinada distância da matéria-alvo e deposita sua energia em determinados pontos localmente, deixando uma espécie de rastro. Radiações do tipo baixa-TLE – como raios X ou γ – produzem eventos de ionização bem separados espacialmente. Ao contrário, radiações de alta-TLE, como as partículas α , produzem eventos de ionizações mais próximos uns dos outros (Figura 4) (L'ANNUNZIATA, 2016).

Em suma, as radiações do tipo alta-TLE possuem a capacidade de depositar maiores quantidades de energia a cada unidade de comprimento da matéria que atravessam, além de terem maiores probabilidades de ocasionar múltiplas lesões densamente agrupadas (Figura 4). Conseqüentemente, para uma mesma dose absorvida, este tipo de RI é mais prejudicial às células do que a radiação do tipo baixa-TLE (MOORE; STANLEY; GOODARZI, 2014).

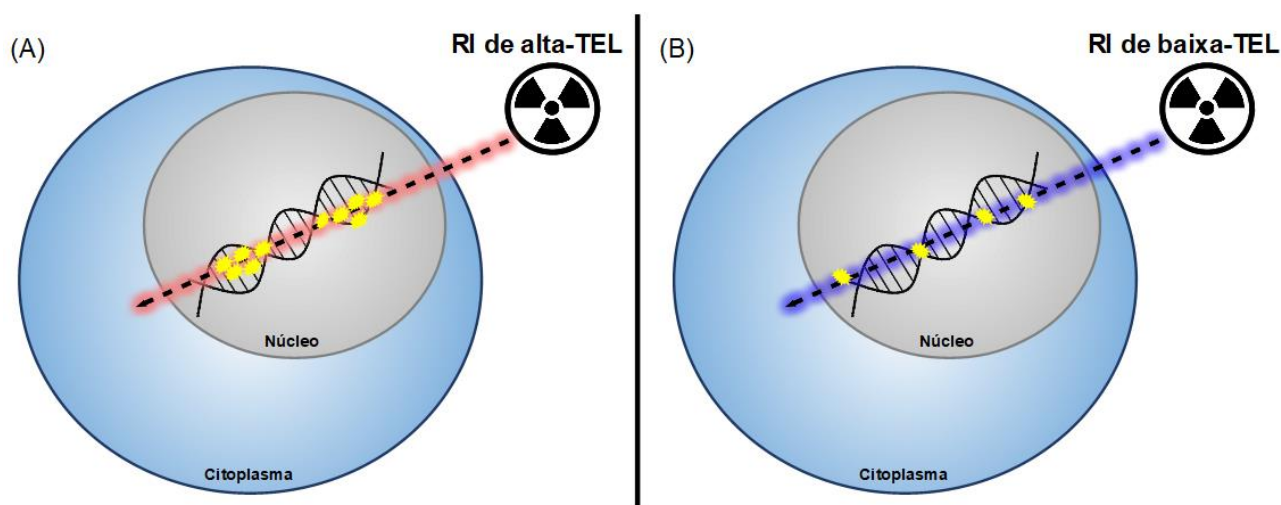


Figura 4. Diferenças entre o padrão de lesões na matéria, representada como o ADN de uma célula eucariótica, segundo o tipo de transferência de energia linear (TLE) da fonte de radiação ionizante (RI). (A) Radiação de alta-TLE provocando lesões agrupadas em maior quantidade quando comparadas com (B), radiação de baixa-TLE que causa lesões espaçadas e em menor quantidade. Fonte: adaptada de (MOORE; STANLEY; GOODARZI, 2014).

Durante muitos anos, foi tradicionalmente aceito que os efeitos da RI em um tecido eram consequência das lesões no ácido desoxirribonucleico (ADN) de células cujo núcleo fora diretamente atingido por este agente estressor. Segundo esta corrente de raciocínio, o dano ao ADN ocorre durante e/ou rapidamente

após o núcleo celular ser irradiado. Entretanto, desde o final do século XX, dados importantes foram sendo publicados, demonstrando que células nos arredores da célula-alvo da RI também apresentam anormalidades bioquímicas – os denominados “efeitos não-direcionados” (*non-targeted effects*) ou também “efeito espectador” (*bystander effect*). A partir da comunicação celular por meio de junções comunicantes e/ou pela liberação de fatores solúveis no meio, as células diretamente irradiadas transmitem sinais moleculares para as células vizinhas, resultando em importantes mudanças biológicas que incluem alterações no metabolismo oxidativo – como aumento na geração de espécies reativas de oxigênio – e instabilidade genômica – como troca entre cromátides irmãs, quebras de fita simples e duplas no ADN, formação de micronúcleos, alterações cromossômicas, entre outras. Interessantemente, estas alterações moleculares podem inclusive se manifestar na progênie das células tanto diretamente atingidas como das espectadoras (JIANG *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2015; FLUNKERT *et al.*, 2018; HEERAN *et al.*, 2020).

1.2. 8-Oxoguanosina: biomarcadora de danos no ADN

Dos quatro 2'-desoxinucleotídeos existentes, a guanósina é o mais frequentemente afetado pela oxidação devido ao seu baixo potencial redox quando comparado com adenosina, citidina e timidina. Logo, sua forma oxidada denomina-se 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), também conhecida como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxoguanosina) (DELANEY *et al.*, 2012) (Figura 5).

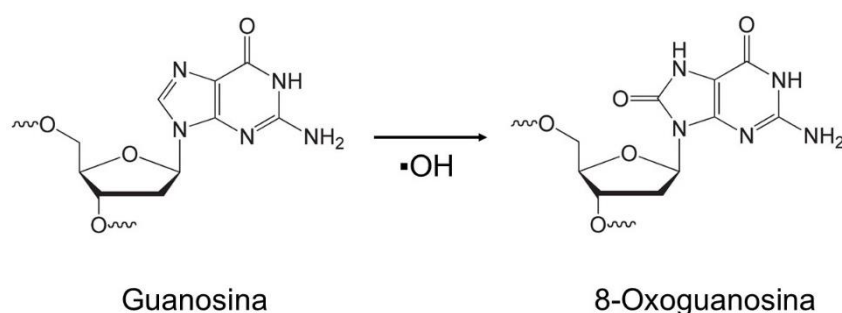


Figura 5. Reação simplificada de formação da 8-oxoguanosina. Imagem adaptada de (DELANEY *et al.*, 2012).

A 8-OHdG é comumente utilizada como biomarcadora de dano oxidativo no ADN porque pode ser produzida pela reação da guanina com moléculas oxidantes distintas, por exemplo: radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), oxigênio molecular ($^1\text{O}_2$), radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), entre outras (CADET *et al.*, 2012). É importante explicitar que as moléculas oxidantes podem ser geradas tanto como subprodutos do próprio metabolismo celular, como também pela interação das células com fatores externos, como a RI e outros. Além disso, a 8-OHdG é um metabólito excretado na urina após ser removida do ADN e das reservas de 2'-deoxirribonucleotídeos trifosfatados, proporcionando maior facilidade na coleta de amostra biológica para propósitos de biomonitoramento em humanos (MESAROS *et al.* 2012). Outra característica importante da 8-OHdG se qualifica no fato de que ela também pode se ligar com adenina durante a replicação do ADN pela ação da própria ADN polimerase, evento este que pode gerar uma mutação do tipo transversão de G:C para T:A durante replicações subsequentes (Figura 6) (LOON; MARKKANEN; HUBSCHER, 2010; D'AUGUSTIN *et al.*, 2020). Portanto, 8-OHdG é considerada um nucleotídeo pré-mutagênico e pode servir adicionalmente como bioindicadora de mutagênese.

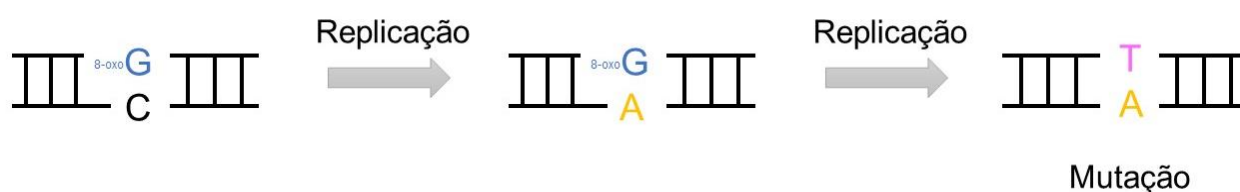


Figura 6. Replicação do ADN contendo 8-oxoguanosina (8-oxoG) em uma das fitas. A guanosina oxidada pode ser pareada com adenina durante a fase S do ciclo celular. Em replicações posteriores, esta adenina será pareada com timina, fixando a mutação de G:C para T:A no genoma de uma das células-filha. Imagem adaptada de (D'AUGUSTIN *et al.*, 2020).

Quando uma fita de ADN possui o pareamento entre 8-OHdG e citosina em sua composição, foram constatadas poucas mudanças na estrutura global da cromatina quando comparado com o par G:C, podendo ser considerada uma parte não lesionada do genoma. O pareamento entre 8-OHdG e adenina, embora não seja típico do clássico modelo de Watson e Crick, também acaba sendo bem acomodado na dupla fita helicoidal do ADN devido à conformação espacial desta ligação se assemelhar ao pareamento entre timina e adenina. Porém, em ambos os casos de pareamento entre 8-OHdG, citosina e adenina, ocorrem alterações

na estabilidade térmica do ADN, medida pela temperatura de fusão, quando comparada com o par canônico G:C (BEARD; BATRA; WILSON, 2010; DELANEY *et al.*, 2012). Consequentemente, estas características fazem com que estes pareamentos errados sejam evitados pela atividade revisora da ADN polimerase durante a replicação (LOON; MARKKANEN; HUBSCHER, 2010).

O acúmulo de 8-OHdG no genoma quando há alguma deficiência em seu reparo tem sido associado com diversas patologias, incluindo câncer (GUO *et al.*, 2016; QING *et al.*, 2019). Logo, para diminuir o acúmulo de 8-OHdG e impedir a ocorrência de mutações e outras consequências prejudiciais às células e ao organismo, o gene humano 8-oxoguanina ADN glicosilase (*hOGG1*), localizado em 3p26, é responsável por traduzir a proteína OGG1. Esta enzima participa do sistema de reparo de excisão de bases do ADN, atuando logo no início da via de reparo, responsável por reconhecer e remover a base 8-oxoguanina do nucleotídeo por meio de sua atividade N-glicosídica, resultando em um sítio apurínico na região. Em seguida, este espaço deixado pela remoção da base danificada é preenchido pelos nucleotídeos corretos por enzimas subsequentes na via (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

O polimorfismo mais estudado em *hOGG1* (rs1052133), o qual ocorre no exon 7, resultando em uma substituição do aminoácido serina por cisteína no códon 326 (Ser326Cys), vem sendo proposto como uma mutação que modifica a função da enzima e é associada a um aumento no risco de desenvolvimento de câncer, inclusive câncer de pulmão (BOITEUX; RADICELLA, 2000; YAMANE *et al.*, 2004; VODICKA *et al.*, 2007; JANIK *et al.* 2011; KUMAR *et al.* 2011; DUAN *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2015; GENG; YAO; ZHU, 2014; WEI *et al.*, 2011). Logo, este gene e seu alvo molecular, a 8-OHdG, tornam-se importantes biomarcadores na investigação de possíveis alvos aos danos indiretos provocados pela RI.

1.3. Metilação do ADN e Elementos repetitivos do genoma

A epigenética pode ser descrita como o estudo de mudanças na expressão gênica que não é causada por alterações na sequência nucleotídica do ADN. Em uma abordagem mais ampla, a epigenética é como uma ponte entre o genótipo e fenótipo, configurando um fenômeno que muda o cenário final de

um *locus* ou cromossomo sem mudar a sequência de ADN em si. Por exemplo, mesmo que a grande maioria das células em um organismo multicelular compartilhe a mesma identidade genética, o desenvolvimento deste ser vivo acaba gerando uma grande diversidade de tipos celulares, os quais possuem função celular e um perfil estável de expressão gênica muito diferentes uns dos outros (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007). Um evento epigenético pode ser agrupado em três principais categorias: modificações pós-traducionais em histonas, atuação de ARN não-codificantes e metilação do ADN, sendo este último o alvo do presente estudo.

A metilação do ADN é a marca epigenética mais amplamente estudada, envolve a transferência covalente de um grupo metil para o carbono 5' das citosinas (5-mC). Essa reação ocorre por meio de enzimas chamadas ADN metil transferases, as quais exigem o cofator S-adenosil-L-metionina. A metilação de citosinas ocorre em sua grande maioria em regiões do genoma chamadas ilhas CfG, as quais representam dinucleotídeos de citosina ligada à guanina pela ligação fosfodiéster, sendo esse padrão repetido sequencialmente sem muita interferência de outros nucleotídeos. As ilhas CfG estão presentes em promotores gênicos, sendo que sua hipermetilação geralmente indica diminuição da expressão gênica, enquanto que sua hipometilação geralmente está associada com uma permissividade aumentada para a expressão do gene (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

O perfil de metilação do ADN pode ser uma característica estável e herdada a cada geração celular após a mitose. Mas também podem ocorrer alterações influenciadas por fatores ambientais, como nutrição e exposições ambientais ou ocupacionais a agentes químicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na poluição do ar, cádmio, arsênio, entre outros (MARTIN; FRY, 2018; TIFFON, 2018). Entretanto, ainda pouco se sabe a respeito dos efeitos da radiação ionizante natural, especialmente das partículas alfa liberadas pelo radônio e seus subprodutos, neste processo epigenético nos seres humanos.

Ainda nesta perspectiva da epigenética, os elementos nucleares longos e interestreadados 1 (LINE-1 ou L1) são sequências utilizadas como marcadoras da metilação global, uma vez que representam cerca de 20% do genoma com aproximadamente 500 mil cópias (YANG *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2011). LINE-

1 são sequências repetitivas e transponíveis do genoma, denominadas de retrotransposons, uma vez que utilizam um mecanismo de “copiar e colar” sua sequência em outras partes do genoma por intermédio de um ARN. As sequências L1 são o único elemento repetitivo autônomo e ativo nos seres humanos (ARDELJAN *et al.*, 2017). Estruturalmente, possuem 6 mil pares de bases (pb) de comprimento, contém uma região não traduzida na extremidade 5' (RNT-5'), um quadro aberto de leitura bicistrônico que codifica duas proteínas – ORF1p e ORF2p – e uma cauda poli A na região não traduzida da extremidade 3'. A proteína ORF1p é uma chaperona ligadora de ácidos nucleicos de 40 kDa; já ORF2p é uma proteína de 150 kDa que atua como endonuclease e transcriptase reversa. A RNT-5' contém promotores senso e antisenso que servem como locais de ligação para vários fatores transcricionais, incluindo p53, Runx, SRY e outros (MIOUSSE; KOTURBASH, 2015).

Geralmente, as sequências L1 encontram-se transcricionalmente silenciadas no genoma por meio dos mecanismos epigenéticos, especialmente por uma abundante metilação das numerosas ilhas CfG da RNT-5'. Esta configuração ocorre justamente para impedir a retrotransposição dessas sequências para outros genes ou outras regiões regulatórias importantes, pois pode causar instabilidade genômica, transformação celular para o fenótipo cancerígeno, ou resultar em outras doenças (LANGE *et al.*, 2012; MIOUSSE; KOTURBASH, 2015; XIAO-JIE *et al.*, 2016).

1.4. O radônio e sua relevância para a saúde humana

Devido ao mecanismo de ação da RI nos tecidos vivos, vários estudos *in vitro*, *in vivo* e epidemiológicos fornecem fortes evidências de associação entre a exposição a este agente físico e o aumento no risco de desenvolver câncer (WEAVER *et al.*, 1997; HAMZA *et al.*, 2008; LENG *et al.*, 2013), sendo também associada ao desenvolvimento de outras doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares (LITTLE *et al.*, 2010; BAKER; MOULDER; HOPEWELL, 2011).

O perigo da exposição à RI para a saúde humana e outros seres vivos ficou muito mais evidenciado nos acidentes radioativos, como as bombas atômicas lançadas na Segunda Guerra Mundial, a explosão do quarto reator nuclear em Chernobyl, Ucrânia, e o acidente com cloreto de cézio em Goiânia,

Brasil. Entretanto, estes acidentes podem ser considerados eventos pouco comuns de exposição. Dentre as fontes de radiação que os humanos são expostos de forma mais frequente em seu cotidiano, destaca-se o gás radônio, como mostrado anteriormente na Figura 2.

O radônio²²² (Rn), um dos isótopos formados na cadeia de decaimento do urânio (Figura 5), é um gás incolor, inodoro, insípido e possui um curto tempo de meia-vida de 3,8 dias (WNA, 2020). É um elemento com a capacidade de se distanciar do local de origem, uma vez que durante o processo de decaimento, o Rn formado é impulsionado para longe de seu sítio de formação, e a partícula alfa é liberada na direção oposta. Logo, com esse deslocamento, o Rn pode acabar se difundindo em água, ar ou adentrar mais profundamente em uma matriz rochosa por meio de fissuras (SKEPPSTOM; OLOFSSON, 2007). Quando presente no ar, o Rn se acumula em quaisquer lugares fechados (residências, escolas, museus etc.), sendo comumente denominado de radônio interior. As concentrações de Rn interior podem variar dependendo de fatores como a estação do ano e a constituição geológica do local ou do material de construção do estabelecimento (COLLIGNAN; LE PONNER; MANDIN, 2016; NEUGEBAUER *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017).

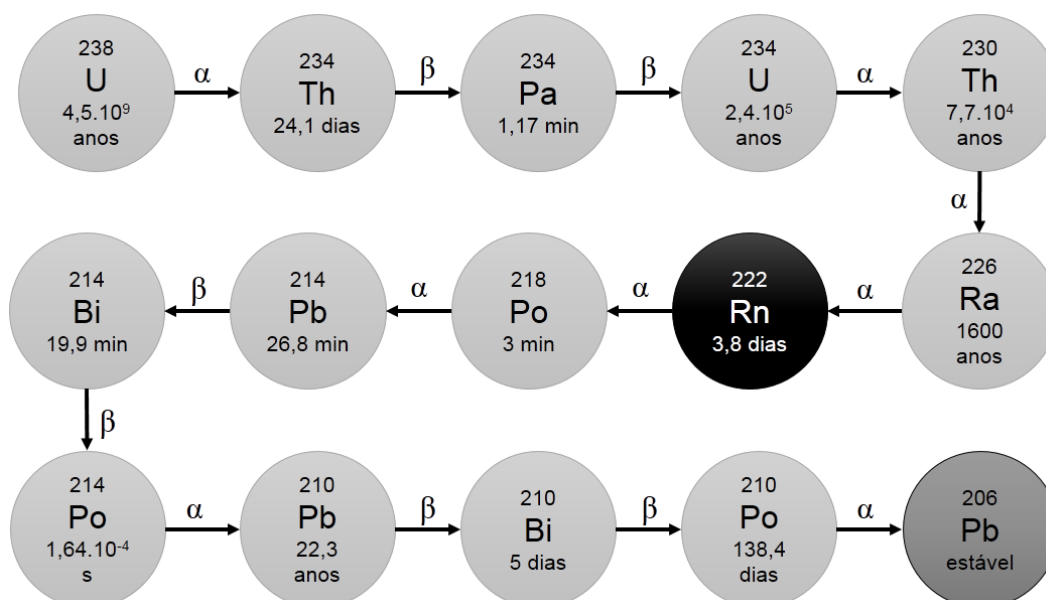


Figura 7. Cadeia de decaimento do urânio. Em cada círculo encontra-se descrito, de cima para baixo, a massa atômica, o símbolo do elemento e seu tempo de meia-vida. Em cima de cada seta é indicado o tipo de partícula (alfa, beta ou gama) emitida. Fonte: adaptada de (WNA, 2020).

Ao ser inalado, o Rn continua seu processo de decaimento no interior dos pulmões, liberando radiação até se transformar no elemento final chumbo-210 (Pb) (Figura 5). A radioatividade deste processo pode gerar mutações no tecido pulmonar, responsáveis por aumentar o risco de carcinogênese neste órgão (OMS, 2009) (Figura 6). Por este fato, o Rn e seus subprodutos de decaimento que também liberam partículas alfa e beta foram categorizados no Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC), que corresponde aos agentes considerados carcinogênicos para os humanos (IARC, 2012).

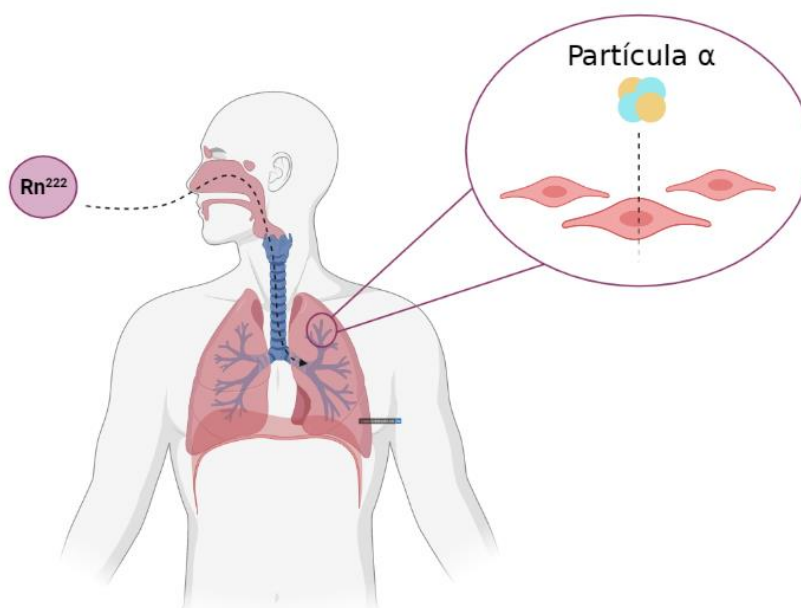


Figura 8. Inalação do gás radônio pelo trato respiratório humano, ressaltando a passagem de uma partícula alfa através de uma célula endotelial dos alvéolos pulmonares. Fonte: figura própria da autora Luíza Xavier, feita com recursos do site Biorender.

Vale citar que a relação entre Rn e câncer foi observada inicialmente em homens que trabalhavam nas minas de extração de urânio há alguns séculos, onde as concentrações de Rn costumam ser bastante elevadas. Apenas em meados de 1950 que pesquisadores começaram a perceber que os mineiros não eram os únicos prejudicados pela ação nociva do Rn (APKIN, 2014; SAMET, 2011). Posteriormente, pesquisas na América do Norte e na Europa comprovaram e estabeleceram uma relação quantitativa entre a exposição doméstica ao Rn interior e o aumento de 10% em média no risco de desenvolver câncer de pulmão (DARBY *et al.*, 2005; KREWSKI *et al.*, 2005). Além disso, a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana estima que o Rn é a segunda

principal causa de morte de câncer de pulmão no mundo, ficando atrás somente do cigarro; e para os não-fumantes, é a primeira causa (USEPA, 2019).

Portanto, a exposição natural ao radônio é um fato de preocupação mundial, ao ponto de muitos países terem implementado medidas de controle e mitigação de exposição a este gás, além de disponibilizarem para a população informações sobre esta problemática (USEPA, 2016). Como parte destes projetos, vários países construíram mapas dos níveis de radiação de sua região – ver por exemplo, o mapa dos Estados Unidos (USEPA, 2018), Canadá (C-NRPP, 2021), Inglaterra e outros países europeus (UKHSA, 2018; GRUBER *et al.*, 2013). Essas ações governamentais facilitam o gerenciamento do risco à saúde das populações.

Em se tratando dos países em desenvolvimento, esta preocupação de minimizar o perigo da radiação de fundo começou a ser percebida somente no início dos anos 2000. No Brasil, por exemplo, ainda não há regulamentos ou leis que delimitam, controlam ou remedeiam a exposição ao Rn. Entretanto, esforços têm sido feitos em iniciar atividades de caracterização e gerenciamento do risco, por exemplo, a realização de medições de radioatividade natural em diversas regiões de nosso país para futuramente se criar o mapa dos níveis de Rn no Brasil (DANTAS *et al.* 2019; SILVA *et al.*, 2014).

1.5. Um cenário particular de radioatividade natural no nordeste brasileiro

No estado do Rio Grande do Norte, Brasil, o município de Lajes Pintadas constitui uma região de interesse para investigações científicas multidisciplinares envolvendo tanto a Geologia como os vários campos de atuação da Biologia, uma vez que vivencia uma problemática particular. Lajes Pintadas foi reconhecido oficialmente como município em 31 de dezembro de 1958; situa-se na mesorregião Agreste Potiguar a 136 km da capital do estado e apresenta limites com as cidades São Tomé, Santa Cruz e Campo Redondo (Figura 6); possui uma área de aproximadamente 130 km² e uma população de cerca de 4.700 habitantes, segundo o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2010 (IBGE, 2020).

Esta cidade se desenvolveu em uma região geologicamente antiga, a microrregião da Borborema Potiguar, formada por rochas da era Pré-Cambriana como o granito, migmatitos, pegmatitos, entre outras, sendo que o urânio e o tório podem ser encontrados na forma de elementos traços na constituição dessas formações rochosas (CPRM, 2006). Além disso, Campos e colaboradores verificaram que as concentrações de Rn interior na cidade ultrapassam o limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 100 Bq/m^3 (CAMPOS *et al.*, 2013; OMS, 2009).

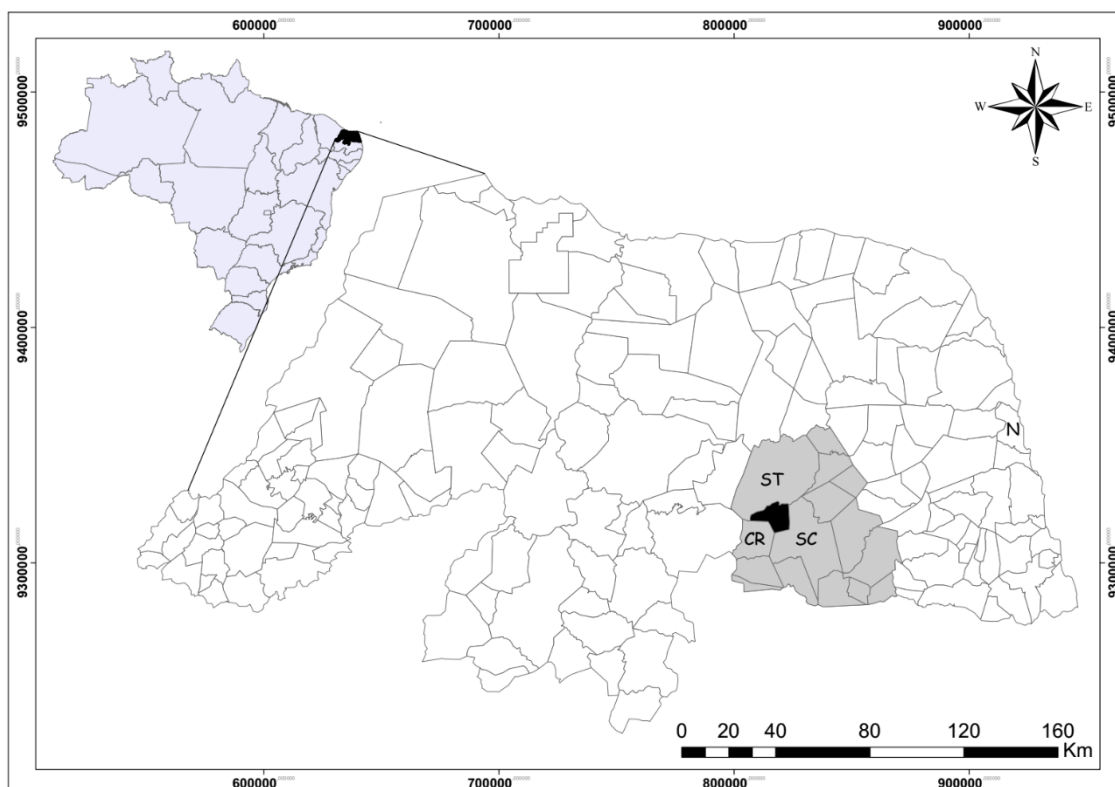


Figura 9. Mapa da localização geográfica de Lajes Pintadas. Na borda superior esquerda está representado o mapa do Brasil com destaque em preto no estado do Rio Grande do Norte, o qual encontra-se ampliado com a microrregião da Borborema Potiguar em cor cinza. O município de Lajes Pintadas distingue-se dos demais pela cor preta. ST, São Tomé. SC, Santa Cruz. CR, Campo Redondo. N, Natal, a capital do estado. Fonte: imagem própria de Luíza Xavier, feita com mapas disponíveis na internet.

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a taxa ajustada à população brasileira de mortalidade por câncer pulmonar, a cada 100 mil habitantes entre 2010 e 2017 em Lajes Pintadas é de 9,72, próxima aos 12,22 da capital do estado, Natal (INCA, 2017). Levando em conta que Lajes Pintadas

possui população mais de 100 vezes menor que Natal, pode-se supor que essa taxa de mortalidade é elevada para a região.

Logo, em Lajes Pintadas tem-se uma característica ambiental possível de ser considerada uma das causas das elevadas taxas de mortalidade de câncer pulmonar observadas na última década neste local. Algumas pesquisas científicas já foram realizadas no município com o intuito de investigar os efeitos da RI natural na mortalidade e reprodução de micro crustáceos (DANTAS *et al.*, 2013), como também o efeito genotóxico em *Drosophila melanogaster* (VERÇOSA *et al.*, 2017). Comparativamente, pesquisas em outras cidades na região semiárida do estado do Rio Grande do Norte já foram desenvolvidas e executadas com o intuito de também verificar os efeitos da radioatividade e outros fatores ambientais nos seres vivos. Por exemplo, foi verificado que águas superficiais e subterrâneas do açude no município de Lucrécia possuíam níveis mais altos de radioatividade (partículas alfa e beta), metais pesados e cianobactérias em comparação com águas de uma região controle (cidade de Natal). Esses fatores foram associados com níveis maiores de micronúcleos e outras alterações nucleares em peixes deste açude (MARCON *et al.* 2010), na planta *Tradescantia pallida* e em culturas *in vitro* de linfócitos humanos (GARCIA *et al.* 2011), como também em células da mucosa bucal de humanos que residiam no município (MARCON *et al.* 2017). Além disso, no município de Parelhas foram analisados parâmetros físico-químicos, metais pesados e radioatividade (partículas alfa e beta) na água do açude local, Boqueirão. Os pesquisadores observaram que esses fatores estavam associados a um aumento nos biomarcadores de danos no ADN, obtidos pelo teste do micronúcleo, tanto em peixes (*Oreochromis niloticus*) quanto em cultura *in vitro* de linfócitos humanos (CHAVES *et al.* 2016).

De fato, percebe-se um crescente desenvolvimento de pesquisas científicas no estado do Rio Grande do Norte a fim de analisar os efeitos mutagênicos da poluição da água, um compartimento ambiental importante como veículo de doenças. Entretanto, ainda não foram conduzidos estudos com seres humanos em Lajes Pintadas e, pelo exposto, fica mais explícito a necessidade de realizar pesquisas a nível bioquímico e molecular com os moradores do município a fim de investigar mais profundamente como a exposição ao Rn e outros agentes ambientais, o estilo de vida e o perfil genético

dessa população interagem entre si para a contribuição do estado de saúde geral dos indivíduos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos e epigenéticos da RI derivada do radônio em nível sistêmico, em moradores do município de Lajes Pintadas/RN, como também em nível celular a partir de cultura de células.

Os objetivos específicos incluem:

- Realizar medições de Rn no interior das residências dos participantes da pesquisa.
- Quantificar a 8-oxo-2'-deoxiguanosina em amostras de urina de indivíduos expostos e não-expostos a altas concentrações de radônio.
- Determinar a frequência alélica e genotípica do polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1*.
- Verificar a exposição ao chumbo por meio da quantificação deste metal no sangue dos indivíduos recrutados.
- Analisar a metilação global do genoma por meio das citosinas metiladas das sequências LINE-1 das células sanguíneas dos participantes dos grupos LP e controle.
- Verificar a influência dos níveis de radônio nos biomarcadores citados acima por meio de modelos estatísticos.
- Quantificar a porcentagem de citosinas metiladas no promotor das sequências LINE-1 em células pulmonares expostas a diferentes doses de partículas α .
- Analisar o perfil de metilação das sequências LINE-1 na progênie das células irradiadas com distintas doses de partículas α .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostragem

O presente estudo foi inicialmente conduzido por meio de amostra probabilística com 224 pessoas representando a população urbana e rural do município de Lajes Pintadas/RN, caracterizando o grupo caso (grupo LP), e uma amostra de 65 indivíduos residentes em Natal/RN os quais constituem o grupo controle. Com o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (CAAE 20368713.8.0000.5537), procedeu-se ao recrutamento de adolescentes (12 a 18 anos), adultos (19 a 59 anos) e idosos (≥ 60 anos de idade). Informações sobre a pesquisa – objetivos, riscos e benefícios foram explicadas aos participantes tanto verbalmente como por escrito no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e no Termo de Assentimento para as crianças, e a concordância da participação voluntária de todos os envolvidos foi obtida por escrito com a assinatura dos termos.

O perfil demográfico e o estilo de vida de todos os indivíduos recrutados foram obtidos por meio de um questionário (Apêndice A), o qual abrangeu perguntas a respeito de fatores sociodemográficos (idade, sexo, escolaridade, integrantes da família e tipo de trabalho exercido pelo entrevistado), estilos de vida (hábito de fumar, ingerir bebidas alcoólicas, frutas e verduras e prática de exercícios físicos), e histórico médico (histórico de câncer na família e consumo de medicamentos). Além disso, testes bioquímicos de rotina nas análises clínicas (hemograma, colesterol, triglicérides e glicemia) foram realizados por um laboratório terceirizado seguindo protocolos padrões para métodos automáticos do campo de análises clínicas, a fim de avaliar o estado geral de saúde dos participantes.

O recrutamento dos indivíduos, que consistiu em entrevista com questionário e coleta de amostras de sangue e urina, foi executado em três campanhas: uma em julho de 2014 e outra em abril de 2015 para o grupo LP, e uma campanha em julho de 2017 para o grupo controle em Natal.

3.2. Quantificação de radônio interior

A concentração de Rn-222 (Bq/m^3) foi medida por emanometria passiva, utilizando-se detectores do tipo electret do sistema da RADELEC (Campos *et al.* 2013). Os aparelhos foram colocados uma distância de 50 cm do chão nos quartos de 125 residências – 82 residências em Lajes Pintadas e 43 em Natal e deixados por um período de 3 meses antes da leitura. Os dispositivos de medição foram colocados nas residências nos mesmos meses das campanhas de recrutamento citadas no item 3.1. As leituras foram realizadas em triplicata e o controle de qualidade das mesmas foi realizado utilizando materiais de referência certificados pelo fabricante do instrumento.

3.3. Quantificação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina urinária

Amostras de urina de 82 residentes de Lajes Pintadas e 43 na cidade de Natal foram coletadas para a quantificação de 8-OHdG utilizando o *DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Kit* (Cayman Chemical, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

O teste consiste nas seguintes etapas: **(I)** Preparação das amostras e dos reagentes: as amostras de urina foram coletadas e transportadas refrigeradas ao laboratório, onde permaneceram congeladas a -20°C até a realização dos experimentos. Cada amostra foi analisada em três diluições (1:250, 1:500 e 1:1000) e cada uma destas foi testada em duplicata nas placas de 96 poços fornecidas pelo kit. Os reagentes do kit foram reconstituídos e preparados segundo as recomendações do fabricante. Quando necessário, utilizou-se água ultrapura (*Milli-Q*) autoclavada. **(II)** Montagem das placas: com reagentes e amostras prontos, os mesmos foram pipetados para os poços das placas seguindo a ordem e volume especificados no protocolo fornecido pelo fabricante. **(III)** Incubação: logo após terminar de preparar as placas, há o período de incubação das mesmas, permitindo que ocorra a ligação entre a 8-OHdG e os anticorpos adsorvidos nas placas. **(IV)** Leitura das placas: em seguida à incubação, deve-se realizar cinco lavagens das placas com a solução indicada no protocolo e adicionar o reagente específico para revelar a reação de ligação por meio de uma coloração amarela da solução. A absorbância do meio nos poços das placas é obtida utilizando-se espectrofotômetro em comprimento de

onda de 410 nm. **(V)** Concentração final de 8-oxoguanosina: os valores das absorvâncias obtidos foram digitados em uma planilha do programa Microsoft Excel disponível para baixar gratuitamente no endereço eletrônico do fabricante (Cayman Chemical), já com todas as fórmulas prontas para o cálculo dos níveis de 8-OHdG. A concentração final foi obtida extraíndo-se a média das concentrações das diluições de uma determinada amostra. Além disso, foram excluídos das análises os resultados cujo valor $B/B_0 > 80\%$ e/ou $< 20\%$, assim como os resultados cuja variação da concentração entre diluições fora maior que 20%, conforme sugerido pelo fabricante.

3.4. Extração de ADN

O ADN genômico dos indivíduos incluídos na pesquisa foi obtido a partir de 4 mL do sangue total periférico colhido com EDTA, utilizando-se o kit QIAmp DNA Blood Mini (Qiagen, EUA). A integridade das amostras de ADN foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE pH 8,0, corado com o corante GelRed (Biotium, EUA) e documentadas por imagem pelo sistema Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, EUA) com o programa Image Lab™ versão 5.1 (Bio-Rad, EUA). A quantificação do ADN foi realizada por espectrofotometria a 230, 260 e 280 nm, e sua pureza determinada pela razão 260/280 e 260/230 utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo).

3.5. Determinação do polimorfismo em *hOGG1*

O polimorfismo Ser326Cys (rs1052133) no gene *hOGG1* da população-alvo – 86 grupo LP e 43 grupo controle – foi determinado pelo método da reação em cadeia da polimerase acoplada com o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição seguindo o artigo de Hu e Ahrendt (HU; AHRENDT, 2005) com pequenas modificações.

O fragmento de 200 pb foi amplificado utilizando-se os iniciadores (*primers*) senso: 5'-ACTGTCAGTAGTCTCACCAG-3' e antisenso: 5'-GGAAGGTGCTTGGGGAAT-3'. Cada reação de 50 uL da reação em cadeia da polimerase (RCP) conteve: 1 x solução tampão (10mM TrisCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,6 mM MgCl₂); 2,5 mM MgCl₂ (ao total, incluindo o do tampão); 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatados; 0,1 µM de cada

iniciador; 1,5 U da Taq ADN polimerase (Synapse Inc, Brasil) e 100 ng de ADN genômico. Os microtubos contendo os reagentes foram pré-aquecidos a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 40 s e 72°C por 60 s, com uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos da RCP foram digeridos com 10 unidades da enzima Fnu4HI (SibEnzyme, Rússia) a 37°C por 2 horas. Em seguida, os produtos da digestão foram separados em gel de agarose a 2,5% pela corrida eletroforética a 3 V/cm, sendo corados com GelRed (Biotium, EUA).

3.6. Metilação das sequências LINE-1

A metilação global do genoma foi realizada pela análise de restrição combinada com bisulfite das sequências LINE-1 em 122 moradores de Lajes Pintadas e 58 residentes em Natal. Inicialmente, a modificação por bisulfite de aproximadamente 1 µg de cada amostra de ADN foi feita com o EpiTec Bisulfite Kit (Qiagen, EUA) seguindo o protocolo disponível pelo fabricante.

Em seguida, a RCP do elemento LINE-1 e a digestão enzimática dos produtos da RCP foram executadas conforme descrito em Yang e colaboradores (YANG *et al.*, 2004), com algumas modificações. Os primers utilizados para este ensaio foram: senso 5'-TTGAGTTGTGGTGGGTTTTATTAG-3' e anti-senso 5'-TCATCTCACTAAAAATACCAAACA-3'. Aproximadamente 100 ng de ADN convertido por bisulfite foram usados em uma reação de 50 µL contendo água ultrapura estéril para completar o volume final, 1 X tampão (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 50 mM KCl; 1mM Triton X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, 0,1 µM de cada iniciador e 1,5 U de Taq polimerase (Synapse Inc, Brasil).

Os produtos da RCP foram digeridos com 10 U da enzima *Hinf* I (SibEnzyme, Rússia), 1 x tampão e água ultrapura estéril para completar o volume em uma reação de 25 µL, a qual foi incubada a 37°C por 2 horas. Os fragmentos gerados desta etapa foram separados em gel de agarose a 2,5%, corados com GelRed (Biotium, EUA) e documentados com Gel DocTM XR+ (Bio-Rad, EUA). Os fragmentos de tamanho 285, 247, 166, 128 e 66 pares de base (pb) indicavam o ADN metilado, enquanto que o fragmento de 413 pb indicava o ADN não-metilado. As imagens dos géis foram utilizadas para a densitometria

pelo programa Image Lab™ versão 5.1 (Bio-Rad, EUA), o qual calculou a porcentagem de citosinas metiladas (%Cm) segundo a equação: $\%Cm = [A / (A + B)] \times 100$, na qual “A” é a intensidade da banda de interesse e “B” é a intensidade de todas as outras bandas da mesma coluna.

3.7. Medida de chumbo sanguíneo

O chumbo sanguíneo foi quantificado em 118 indivíduos do grupo LP e 52 do grupo controle, pelo método de espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite (VARIAN AA240Z, GTA 120) seguindo o protocolo descrito por Menezes Filho e colaboradores (MENEZES FILHO; VIANA; PAES, 2012).

3.8. Experimento *in vitro*

3.8.1. Cultura de células

Foram utilizados fibroblastos de pulmão humano obtidos do repositório Genético de Células do Instituto Coriell para Pesquisas Médicas (Camden, Nova Jersey, Estados Unidos). As células, na passagem 13, foram cultivadas em meio essencial mínimo alfa (MEM α), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de antibióticos (mistura de 100 U/mL de penicilina mais 100 μ g/mL de estreptomicina), sendo todos os reagentes adquiridos pela Sigma. As culturas foram mantidas em incubadoras a 37°C com 5% CO₂.

Assim que o número suficiente de células para a realização dos experimentos fora alcançado, as culturas foram destacadas do fundo das garrafas com tripsina, diluídas em meio de cultura e semeadas em placas de aço inoxidável personalizadas, possuindo diâmetro interno de 36 mm, cujo fundo é formado por uma camada substituível de polietileno tereftalato – conhecida como “Mylar” – a qual possui 1,5 μ m de espessura. Para facilitar a aderência celular nestas placas, a superfície da Mylar foi coberta com 1 mL de mistura de fibronectina e colágeno (*FNC coating mix*, AthenaES™), a qual foi sobreposta com 1 mL de meio MEM α e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Após este intervalo de tempo, todo o meio nas placas foi aspirado e 10⁵ células foram imediatamente semeadas em cada placa.

O cultivo das células nas placas *Mylar* se deu por 11 dias, o qual foi o equivalente para esta cultura específica atingir a total confluência a fim de obter células inibidas pelo contato devido à alta densidade celular. Durante este período, as culturas foram realimentadas com meio MEM α a cada 2 dias, e os experimentos com a radiação ionizante ocorreu 48 horas após a última troca de meio de cultura (no 11^o dia).

3.8.2. Irradiação de partículas α

As irradiações com partículas alfa foram conduzidas em uma câmara personalizada mantida a 37°C com atmosfera de 5% CO₂, onde abriga o irradiador que consiste nos principais componentes: discos de Am-241, a fonte emissora das partículas α ; sistema de rotação; colimador; delimitador do feixe de radiação e janela de saída; sistema eletrônico de obturador e uma película de *Mylar* para suportar a cultura de células. Esses sistemas foram montados dentro de uma pequena câmara selada de acrílico possuindo 1,2 cm de espessura, a qual é preenchida com gás hélio para não ocorrer atenuação das partículas alfa (NETI *et al.*, 2004).

A irradiação ocorreu por baixo das placas de cultivo, por meio da base de *Mylar*, e quando as partículas α atingiram a monocamada celular, possuem uma energia média de 3,7 MeV (TLE de 109 keV/ μ m). As células receberam uma taxa de dose absorvida média de 2 cGy/min e no total, foram expostas a 0 (controle), 0,25, 0,5 e 1 Gy; para cada uma dessas doses, foram utilizadas 3 placas (triplicata) de cultura celular. Imediatamente após cada placa ser irradiada, as células foram destacadas da película *Mylar* com o uso da tripsina, foram contadas com um hemocitômetro, centrifugadas e o sedimento celular resultante foi congelado em freezer a -80°C até a realização dos próximos ensaios. Todo este experimento foi repetido mais uma vez em momento posterior distinto.

Em uma segunda campanha, estes mesmos procedimentos foram realizados novamente com a diferença de que após a irradiação, as células foram destacadas da *Mylar* com tripsina, contadas, e em vez de congeladas, foram semeadas novamente em uma garrafa de cultivo (75 cm² de área), onde permaneceram crescendo por mais 8 dias [o equivalente a 4 duplicações de

população (*population doubling*)] em incubadora a 37°C e atmosfera a 5% CO₂, com o meio de cultura sendo trocado a cada 2-3 dias. Este novo experimento foi realizado a fim de investigar a metilação de L1 nas células-filhas das células irradiadas (grupo progênie).

3.8.3. Metilação das sequências LINE-1

A identificação e quantificação de citosinas metiladas das sequências LINE-1 foram realizadas a partir dos seguintes procedimentos principais: extração de ADN dos sedimentos celulares obtidos após a irradiação; modificação do ADN genômico por bisulfito; reação em cadeia da polimerase para a região específica de interesse, no caso o promotor de L1, e por fim, o pirosequenciamento. Essas etapas foram realizadas pela empresa EpigenDx Inc pela aquisição do serviço “*DNA Methylation Analysis – Premium*”. Estes experimentos foram efetuados com pelo menos uma amostra de cada cultura irradiada em todas as doses aplicadas de todos os experimentos mencionados nas seções acima.

A partir da análise do pirograma, foi obtido a %Cm em 4 posições diferentes na região promotora de LINE-1 (Anexo A). Logo, foi realizada a estatística descritiva para estes dados: primeiramente foi obtida a média (e desvio padrão) da %Cm entre as 4 posições do promotor gênico de L1 para cada amostra, e a partir disso foi possível obter a média de citosinas metiladas de cada tratamento específico. Além disso, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para verificar se houve diferença entre as %Cm de acordo com as distintas doses absorvidas médias de partículas alfa aplicadas nas culturas celulares.

3.9. Análises estatísticas

Análises descritiva e inferencial foram realizadas. A distribuição das variáveis contínuas foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise de variáveis que podem influenciar o nível de 8-OHdG urinária, como alimentação, estilo de vida e exposição ocupacional a outras substâncias, foi avaliada utilizando os testes de Mann-Whitney. A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg do polimorfismo em *hOGG1* foi realizada utilizando o teste Qui-

quadrado. A diferença da metilação global do ADN entre os dois grupos (LP e controle) e entre outras variáveis qualitativas foi analisada com o teste T-Student. Correlações entre as diversas variáveis coletadas foram feitas pelo teste de Pearson.

Foram realizados dois modelos principais de regressão linear generalizada utilizando distribuição gama, seguido do teste de Bonferroni como análise post-hoc, para verificar (I) o efeito dos níveis de Rn interior e do polimorfismo em *hOGG1* sobre a oxidação no genoma, representada pelas concentrações de 8-OHdG urinária; (II) qual a influência do Rn interior, concentrações sanguíneas de chumbo e outras variáveis que possuíram correlação significativa sobre a %Cm de LINE-1. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujo valor-p $\leq 0,05$. O programa utilizado para executar todos os testes foi o SPSS (IBM Corporation, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra de indivíduos

As características gerais da amostra de indivíduos recrutados para este estudo podem ser conferidas na Tabela 1. Na Tabela 2 estão descritos os resultados dos testes hematológicos e bioquímicos. A partir dessas características, os participantes foram considerados saudáveis.

Tabela 1. Dados sociodemográficos e do estilo de vida dos residentes em Lajes Pintadas (grupo LP) e Natal (grupo controle), Brasil.

Variável	Categoria	Grupo Controle N (%)	Grupo LP N (%)
Idade	--	35,29 ± 14,84	30,69 ± 23,86 ^a
Sexo	Feminino	41 (63,1)	140 (62,5)
	Masculino	24 (36,9)	84 (37,5)
Tipo de trabalho	Fazendeiro	1 (1,6)	38 (17)
	Dona de casa	4 (6,5)	24 (10,7)
	Estudante	5 (8,1)	1 (0,4)
	Outro	52 (83,8)	161 (71,9)
Trabalha com produtos químicos	Não	45 (75)	169 (75,4)
	Sim	15 (25)	55 (24,6)
Consumo de bebidas alcoólicas	Não	40 (64,5)	136 (60,7)
	Sim	21 (33,9)	37 (16,5)
	Não respondeu	1 (1,6)	51 (22,8)
Hábitos tabagistas	Não	39 (66,1)	152 (67,8)
	Sim	4 (6,8)	23 (10,3)
	Ex-fumante	16 (27,1)	49 (21,9)
	Não	39 (65)	77 (34,4)

Prática de exercícios físicos	Sim	21 (35)	147 (65,6)
Consumo de frutas e verduras	Não	1 (1,6)	18 (8)
	Sim	60 (98,4)	206 (92)
Tipo de água para ingestão	Torneira	20 (30,7)	116 (51,8)
	Engarrafada	38 (58,5)	44 (19,6)
	Torneira e engarrafada	1 (1,6)	1 (0,4)
	Perfuração (poços)	0 (0)	7 (3,1)
	Cisterna	0 (0)	15 (6,7)
	Não respondeu	6 (9,2)	41 (18,4)
Utilização de medicamentos	Não	35 (53,9)	152 (67,9)
	Sim	26 (40)	72 (32,1)
	Não respondeu	4 (6,1)	0 (0)
Histórico de câncer na família	Não	31 (47,7)	92 (41,1)
	Sim	29 (44,6)	132 (58,9)
	Não respondeu	5 (7,7)	0 (0)
Histórico de defeitos congênitos na família	Não	41 (63)	168 (75)
	Sim	17 (26,2)	54 (24,1)
	Não respondeu	7 (10,8)	2 (0,9)
Histórico de aborto espontâneo	Não	47 (72,4)	162 (72,3)
	Sim	12 (18,4)	61 (27,2)
	Não respondeu	6 (9,2)	1 (0,5)

^a Média \pm desvio padrão.

Tabela 2. Resultados de testes hematológicos e bioquímicos dos indivíduos recrutados.

Parâmetro	Grupo Controle	Grupo LP	Valores de referência ^a
Hemácias (milhões/mm ³)	4,78 ± 0,45	4,56 ± 0,42	4,0 – 5,5
Hemoglobina (g/dL)	13,91 ± 1,28	12,76 ± 1,28	12 – 17
Hematócrito (%)	41,89 ± 3,73	38,59 ± 4,37	36 – 50
Volume corpuscular médio – VCM (fL)	87,64 ± 4,25	84,41 ± 6,99	80 – 100
Hemoglobina corpuscular média – HCM (pg)	29,09 ± 1,72	27,99 ± 2,48	27 – 32
Contagem de hemoglobina corpuscular média – CHCM (g/dL)	33,19 ± 0,66	33,10 ± 1,91	33 – 39
Índice de anisocitose – RDW (%)	11,45 ± 0,85	14,21 ± 9,88	10 – 15
Leucócitos totais (n ^o /mm ³)	6.558,46 ± 1.580,43	6.521,12 ± 1.636,41	4.000 – 11.000
Plaquetas (n ^o /mm ³)	290.000 ± 71,81	285.000 ± 83,90	150.000 – 450.000
Glicose (mg/dL)	83,52 ± 28,40	89,42 ± 40,53	< 100
Triglicerídeos (mg/dL)	144,40 ± 76,14	120,93 ± 115,45	< 150
Colesterol total (mg/dL)	192,43 ± 41,33	173,69 ± 61,74	< 200

^a Os valores de referência foram retirados de (BAIN; BATES; LAFFAN, 2016).

4.2. Medição de Rn interior

O Rn interior medido nas residências dos grupos LP e controle apresentaram medidas descritas na Tabela 3. Nenhuma residência em Natal obteve concentrações maiores que 100 Bq/m^3 , valor este correspondente ao limite estabelecido pela OMS (OMS, 2009). Em contrapartida, 98,8% das residências testadas em Lajes Pintadas ultrapassaram esse ponto de corte (Figura 10), sendo que esta cidade apresentou valores 6,5 vezes maiores que os observados na cidade controle, Natal (valor-p < 0,001).

Tabela 3. Estatística descritiva para o gás radônio (Bq/m^3) medido no interior de residências em duas cidades distintas do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

Grupo	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	43	46,46	23,22	45,50	5,00	84,00
LP	82	303,55	228,13	183,29	75,78	1421,40

Grupo controle corresponde à cidade Natal; grupo LP corresponde à cidade Lajes Pintadas.

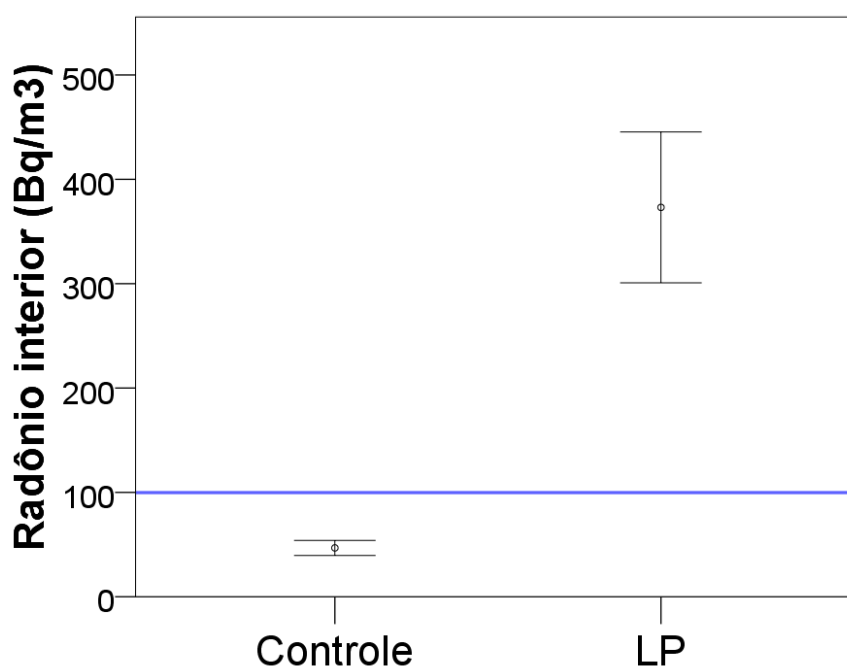


Figura 10. Níveis de radônio medido no interior de residências localizadas em Natal (controle) e Lajes Pintadas (LP), Rio Grande do Norte, Brasil. A linha azul em 100 Bq/m^3 representa o limite de exposição a este gás estabelecido pela Organização Mundial da Saúde. As barras representam o erro padrão com intervalo de confiança 95%.

4.3. Quantificação de 8-OHdG urinária e avaliação do polimorfismo em *hOGG1*

As concentrações médias de 8-OHdG são apresentadas no gráfico da Figura 11. A média (e erro padrão da média) dos grupos controle e LP foram, respectivamente, 128,29 (8,86) e 171,06 ng/mL (12,78). Os indivíduos expostos aos altos níveis de Rn interior apresentaram aproximadamente 1,5 vezes mais danos oxidativos no genoma, representados pelo biomarcador 8-oxoguanosina, em comparação com os expostos a baixos níveis deste gás – Exp. B = 1,49; Intervalo de confiança (IC) 95% = 1,16 – 1,92; valor-p < 0,01 (Exp. B significa expoente de B, é um parâmetro equivalente à razão de chance [*odds ratio*]).

As seguintes variáveis não apresentaram associação com as concentrações de 8-oxoguanosina: sexo (valor-p = 0,140), idade (valor-p = 0,210), consumo de álcool (valor-p = 0,204), tabagismo (valor-p = 0,788), prática de exercícios físicos (valor-p = 0,449), ingestão de frutas e verduras (valor-p = 0,425) e tipo de água consumida pela população – engarrafada (valor-p = 0,480), perfuração (valor-p = 0,478), torneira (valor-p = 0,864) ou cisterna (valor-p = 0,224).

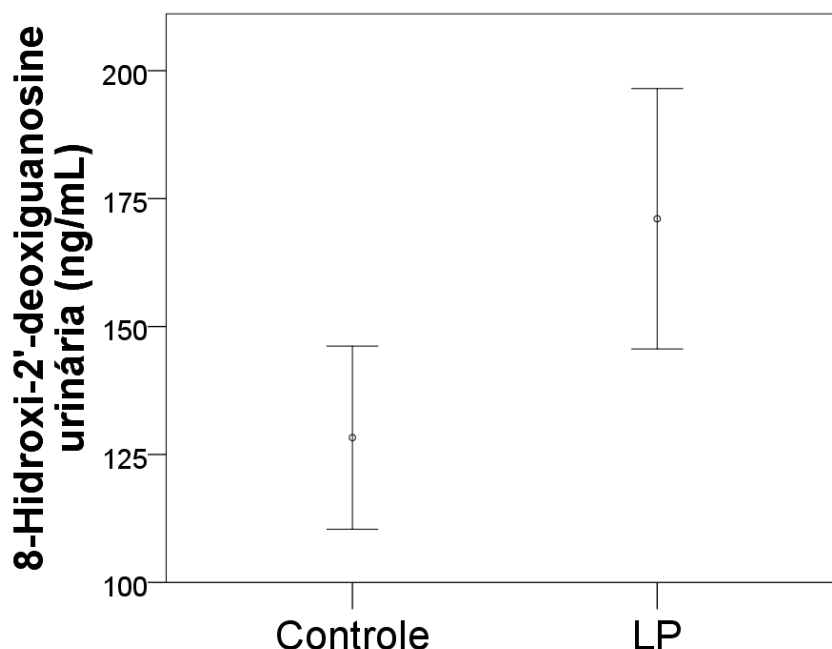


Figura 11. Concentração média de 8-oxoguanosina (ng/mL) de amostras de urina dos grupos de baixo (controle) e alto (LP) níveis de Rn interior. As barras representam o erro padrão com intervalo de confiança 95%.

Ao se analisar o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1*, observou-se que sua frequência genotípica e alélica estavam de acordo com os princípios de Hardy-Weinberg nas populações estudadas (Tabela 4). Além disso, nenhum indivíduo homocigoto para o alelo mutante deste polimorfismo foi detectado. A fim de verificar o quanto o polimorfismo e os níveis de Rn interior modificam as concentrações de 8-OHdG, foi feito um modelo de regressão cujos resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 4. Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1*.

Grupo	Genótipos <i>hOGG1</i>	N	N esperado	Frequência	Frequência	Valor-p
				do alelo variante (Cys)	do alelo selvagem (Ser)	
LP	SerSer	26	27,7	0,20	0,80	0,106*
	SerCys	17	13,6			
	CysCys	0	1,7			
Controle	SerSer	53	54,7	0,15	0,85	0,120*
	SerCys	23	19,5			
	CysCys	0	1,7			

N, número de indivíduos. Asterisco (*) representa valores-p > 0,05, logo, os valores observados nos grupos são consistentes com os princípios de equilíbrio Hardy-Weinberg.

Tabela 5. Influência do gás radônio e polimorfismo no gene *hOGG1* nas concentrações de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina urinária em habitantes de cidades com baixos e altos níveis de Rn interior, a partir do modelo de regressão linear generalizada.

Variável	Exp. B	IC 95%	Valor-p
Radônio interior ($\geq 222,48$ Bq/m ³ , Q4)	1,47	1,00 – 2,172	0,04*
Radônio interior (144,61 a 222,47 Bq/m ³ , Q3)	2,57	1,57 – 4,20	<0,01*
Radônio interior (63,01 a 144,60 Bq/m ³ , Q2)	1,22	0,83 – 1,78	0,29
Radônio interior (0,0 a 63,00 Bq/m ³ , Q1)	--	--	--
<i>hOGG1</i> Ser326Cys	1,10	0,73 – 1,66	0,63
<i>hOGG1</i> Ser326Ser	--	--	--
Radônio interior Q4 x Ser326Ser	2,40	1,20 – 4,70	0,01*

Radônio interior Q4 x Ser326Cys	--	--	--
Radônio interior Q3 x Ser326Ser	2,00	0,99 – 4,03	0,05*
Radônio interior Q3 x Ser326Cys	--	--	--
Radônio interior Q2 x Ser326Ser	0,85	0,38 – 1,92	0,70
Radônio interior Q2 x Ser326Cys	--	--	--
Radônio interior Q1 x Ser326Ser	--	---	--
Radônio interior Q1 x Ser326Cys	--	--	--

Q, quartil. Asterisco (*) representa valor-p <0,05 considerado estatisticamente significativo. Exp. B significa expoente de B, é um parâmetro equivalente à razão de chance (*odds ratio*). Espaços sem números representam categorias de referência, sendo que nas duas últimas linhas foram estatísticas redundantes para o desenvolvimento do modelo.

Pode ser observado que as concentrações de 8-oxoguanosina variaram significativamente apenas nas concentrações mais altas de Rn interior, categorizada em quartis neste modelo – quartil 1 = 0,0 a 63,00 Bq/m³; quartil 2 = 63,01 a 144,60 Bq/m³; quartil 3 = 144,61 a 222,47 Bq/m³; quartil 4 ≥ 222,48 Bq/m³. Este modelo de regressão confirma e reforça o primeiro resultado mencionado, de que os indivíduos expostos a altos níveis de Rn interior possuem em torno de 1,5 vezes maiores concentrações de guanosina oxidada na urina. Além disso, é interessante notar que o polimorfismo analisado isoladamente no modelo não apresenta influência significativa sobre as concentrações de 8-OHdG. Porém, quando combinado com os níveis de Rn interior, pode ser verificado que os indivíduos homocigotos para o alelo selvagem (Ser/Ser) tiveram concentrações de 8-OHdG significativamente maiores em comparação com os heterocigotos (Ser/Cys), considerando a exposição a altos níveis de Rn interior (quartis 3 e 4). Esta relação pode ser representada visualmente na Figura 12.

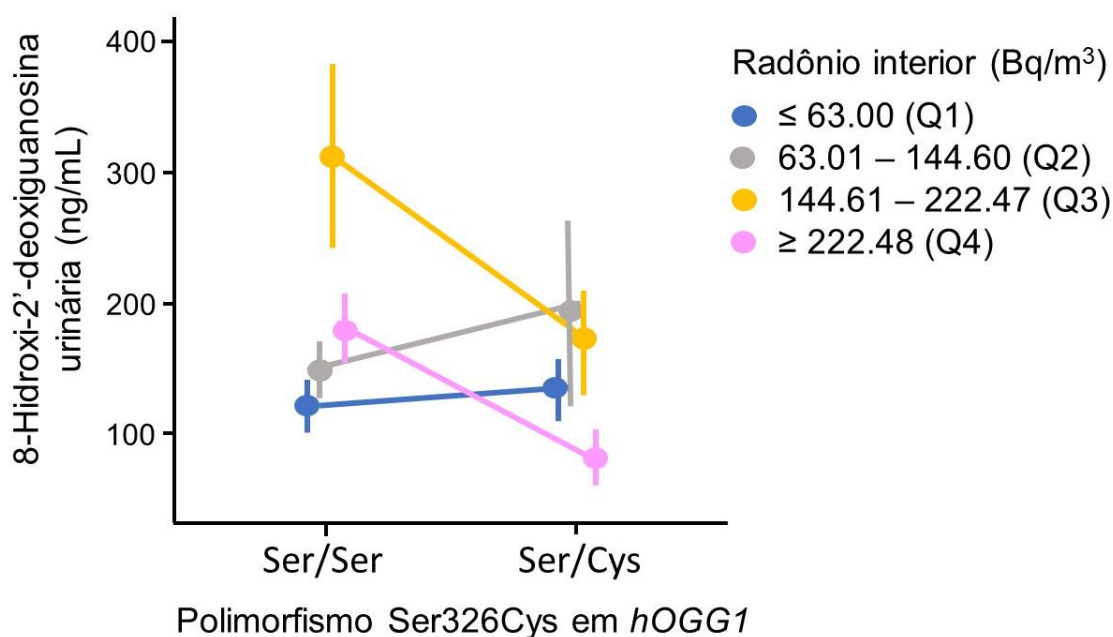


Figura 12. Relação entre as concentrações de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina urinária (ng/mL) (eixo y) e polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1* (eixo x) agrupados segundo os níveis de radônio interior (dividido em quartis, Q1, Q2, Q3 e Q4). Cada ponto representa a média e a barra representa o erro padrão da média.

4.4. Análise de citosinas metiladas em LINE-1 e de chumbo sanguíneo

A média e desvio padrão da %Cm das sequências L1 dos grupos arrolados no estudo foram: 50,23% ± 3,44 para o grupo controle e 51,87% ± 2,96 para o grupo LP, com diferença significativa entre elas (valor-p < 0,001). A distribuição desta variável entre os grupos está representada na Figura 13.

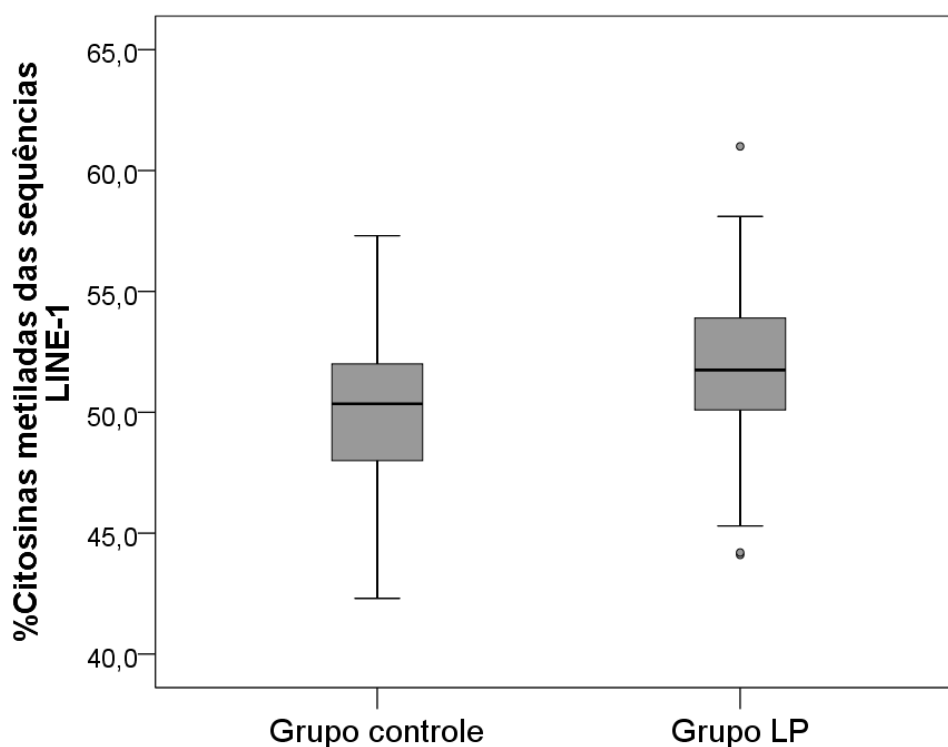


Figura 13. Distribuição da porcentagem de citosinas metiladas das sequências LINE-1 dos grupos controle (cidade com baixos níveis de Rn interior, caixa da esquerda) e LP (cidade com altos níveis de Rn interior, caixa da direita).

As concentrações de Pb sanguíneo nos grupos controle e LP resultaram, respectivamente, em uma média de $1,15 \pm 0,91 \mu\text{g/dL}$ e $1,66 \pm 1,55 \mu\text{g/dL}$. Esses valores não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (valor- $p = 0,182$). Apenas 5,9% dos indivíduos ($N = 7$), exclusivamente do grupo LP apresentaram concentrações acima do regulado pelo CDC de $5 \mu\text{g/dL}$ (EPA, 2019); este subgrupo obteve média de Pb sanguíneo de $6,14 \pm 1,23 \mu\text{g/dL}$.

Observou-se que os níveis de metilação de LINE-1 correlacionaram diretamente com os níveis de radônio interior – coeficiente de Pearson = 0,227, valor- $p < 0,05$. Ao passo que, ao verificar a %Cm em L1 segundo variáveis qualitativas, resultou que as seguintes não apresentaram significância estatística: consumo de bebidas alcoólicas (valor- $p = 0,853$); hábito de fumar (valor- $p = 0,950$); prática de exercícios físicos (valor- $p = 0,460$); ingestão de frutas e verduras (valor- $p = 0,304$); histórico de câncer (valor- $p = 0,325$) e tipo de água utilizada para consumo – torneira (valor- $p = 0,832$), garrafa (valor- $p = 0,876$), perfurada/poços (valor- $p = 0,996$) e cisternas (valor- $p = 0,560$). Vale mencionar que ao realizar os testes T-Student em cada variável acima citada, os

grupos LP e controle foram analisados juntos e separadamente. Essas duas análises resultaram em falta de significância estatística e os valores-p expressos acima são derivados das análises de ambos os grupos juntos.

Já a metilação de L1 entre os sexos feminino e masculino foi a única análise dentre as variáveis qualitativas a apresentar diferença significativa, com os indivíduos do sexo masculino apresentando maior porcentagem de metilação em comparação com o feminino. Ao analisar os grupos separadamente, verificou-se uma diferença estatística entre os sexos no grupo controle, mas não no grupo LP. Como também, a variável dependente apresentou diferença entre os grupos controle e LP no sexo feminino (Tabela 6).

Tabela 6. Níveis de metilação das sequências LINE-1 segundo o sexo dos participantes.

Grupo	Variável	N	Metilação LINE-1 (%)	Desvio padrão	Valor-p
Controle + LP	Sexo feminino	116	50,994	3,342	0,049*
	Sexo masculino	64	51,978	2,871	
Controle	Sexo feminino	39	49,526	3,285	0,024*
	Sexo masculino	19	51,684	3,373	
LP	Sexo Feminino	77	51,738	3,136	0,514
	Sexo Masculino	45	52,102	2,663	
Controle	Sexo Feminino	39	49,526	3,285	0,001*
LP	Sexo Feminino	77	51,738	3,136	
Controle	Sexo Masculino	19	51,684	3,373	0,599
LP	Sexo Masculino	45	52,102	2,663	

Asterisco (*) indica significância estatística ao nível 0,05.

Além disso, foi possível obter um modelo linear generalizado estatisticamente significativo utilizando-se as variáveis radônio interior, chumbo sanguíneo e sexo, sendo ajustadas pela idade (Tabela 7). Segundo este modelo, o gás Rn influenciou de forma direta a metilação de L1, ou seja, quanto maiores as concentrações de Rn interior, maior a %Cm nos promotores destas

sequências gênicas. Já o chumbo e o sexo influenciaram a marca epigenética de forma inversa – quanto maiores as concentrações de chumbo no sangue e caso os indivíduos forem do sexo feminino, menos citosinas em LINE-1 estarão metiladas.

Tabela 7. Parâmetros de influência de algumas variáveis sobre a metilação das sequências genéticas LINE-1, a partir da regressão linear generalizada.

Fatores	Coefficiente B	Exp. B	IC 95%	Valor-p
Radônio interior	0,004	1,004	1,002 – 1,006	0,001*
Chumbo sanguíneo	-0,521	0,594	0,397 – 0,888	0,011*
Sexo	-1,193	0,303	0,104 – 0,883	0,029*
Idade	0,016	1,016	0,989 – 1,043	0,244

Asterisco (*) representa valor-p $\leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Exp. B significa expoente de B, é um parâmetro equivalente à razão de chance (*odds ratio*).

4.5. Metilação de LINE-1 das células expostas a partículas α *in vitro*

A %Cm das sequências LINE-1 referente às células expostas a distintas doses médias absorvidas de partículas α está descrita na Tabela 8 a seguir. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na metilação de L1 dos fibroblastos expostos às partículas α em relação aos que não foram expostos a nenhuma radiação ionizante. O mesmo resultado foi obtido quando se avaliou a progênie das células irradiadas. Além disso, também não houve diferença estatisticamente significativa quando cada grupo foi comparado com todos os demais grupos, segundo os resultados das comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 8. Metilação das sequências LINE-1 em fibroblastos de pulmão humano expostos a partículas alfa.

Grupo (i)	N	Média de Citosinas metiladas (%)	Desvio padrão	Grupo comparado (j)	Diferença média (i – j)	Valor-p
Controle	12	70,76	5,30	0,25 Gy	-2,75	0,77
				0,5 Gy	-2,90	0,72
				1 Gy	-2,00	0,94
				Controle -P	-4,43	0,20
				0,25 Gy -P	-3,77	0,40
				0,5 Gy -P	-4,46	0,19
				1 Gy -P	-2,42	0,86
0,25 Gy	12	73,51	4,26	Controle	2,75	0,77
				0,5 Gy	-0,15	1,00
				1 Gy	0,75	1,00
				Controle -P	-1,68	0,98
				0,25 Gy -P	-1,02	0,99
				0,5 Gy -P	-1,71	0,97
				1 Gy -P	0,32	1,00
0,5 Gy	12	73,67	3,83	Controle	2,90	0,72
				0,25 Gy	0,15	1,00
				1 Gy	0,90	1,00
				Controle -P	-1,52	0,98
				0,25 Gy -P	-0,86	1,00
				0,5 Gy -P	-1,55	0,98
				1 Gy -P	0,47	1,00
1 Gy	12	72,76	4,20	Controle	2,00	0,94
				0,25 Gy	-0,75	1,00
				0,5 Gy	-0,90	1,00
				Controle -P	-2,43	0,86
				0,25 Gy -P	-1,77	0,97

				0,5 Gy -P	-2,46	0,85
				1 Gy -P	-0,42	1,00
Controle -P	12	75,20	2,84	Controle	4,43	0,20
				0,25 Gy	1,68	0,98
				0,5 Gy	1,52	0,98
				1 Gy	2,43	0,86
				0,25 Gy -P	0,66	1,00
				0,5 Gy -P	-0,02	1,00
				1 Gy -P	2,00	0,94
0,25 Gy -P	12	74,54	5,29	Controle	3,77	0,40
				0,25 Gy	1,02	0,99
				0,5 Gy	0,86	1,00
				1 Gy	1,77	0,97
				Controle -P	-0,66	1,00
				0,5 Gy -P	-0,68	1,00
				1 Gy -P	1,34	0,99
0,5 Gy -P	12	75,22	5,02	Controle	4,46	0,19
				0,25 Gy	1,71	0,97
				0,5 Gy	1,55	0,98
				1 Gy	2,46	0,85
				Controle -P	0,02	1,00
				0,25 Gy -P	0,68	1,00
				1 Gy -P	2,03	0,94
1 Gy -P	12	73,19	3,10	Controle	2,42	0,86
				0,25 Gy	-0,32	1,00
				0,5 Gy	-0,47	1,00
				1 Gy	0,42	1,00
				Controle -P	-2,00	0,94
				0,25 Gy -P	-1,34	0,99
				0,5 Gy -P	-2,03	0,94

A terminação "-P" indica progênie.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou investigar possíveis influências da radiação ionizante derivada do Rn em aspectos genéticos de indivíduos expostos a elevados níveis deste gás.

Os resultados obtidos sugerem que os altos níveis de Rn interior influenciaram significativamente o biomarcador escolhido de lesão oxidativa no genoma. A associação desses dois fatores também já foi investigada em outros estudos. Primeiramente, Sperati e colaboradores encontraram um efeito significativo entre a radiação ionizante no interior das residências e as concentrações crescentes de 8-OHdG apenas nos indivíduos do sexo feminino, possivelmente por passarem mais tempo dentro das moradias em comparação com os homens. Porém, os pesquisadores atribuíram este efeito à radiação gama e não ao Rn, segundo as análises feitas de modelos de regressão (SPERATI *et al.*, 1999). Podem ser encontradas diferenças entre este e o presente trabalho em relação ao perfil dos participantes – por exemplo, no atual estudo foram recrutados menos indivíduos fumantes, com mais variedade na idade e com ocupações diferentes – e em relação às concentrações de Rn interior – foram obtidas medidas superiores deste gás radiativo no grupo LP. Logo, os resultados deles não corroboram com o do presente estudo, no qual o Rn interior esteve associado significativamente com a 8-OHdG em pessoas expostas a elevados níveis deste gás, independente do sexo do indivíduo analisado.

Posteriormente com uma abordagem distinta, Yanxiao e colaboradores exploraram o efeito hormético do Rn nos indivíduos que frequentam fontes termais na China (YANXIAO *et al.* 2019). Os níveis de Rn e a frequência de exposição foram diferentes do presente estudo: enquanto os autores consideraram apenas o tempo de banho nas fontes termais, no presente trabalho foi avaliado uma exposição crônica, uma vez que os participantes habitam há décadas (87% dos entrevistados no grupo LP vivem na cidade há mais de 30 anos) uma cidade com constantes níveis elevados de Rn no interior de suas residências. Os autores sugerem que o fato das concentrações de 8-OHdG dos visitantes das fontes termais serem mais baixas que as de pessoas de uma área

controle pode ser atribuído à ativação das funções antioxidantes induzidas pelo Rn, embora não tenham mostrado correlações entre a concentração de 8-oxoguanosina, os níveis de Rn das termas e a medida destas funções representada pela tioredoxina redutase.

Dependendo do sistema biológico escolhido como modelo de exposição à RI, os resultados podem variar especialmente se os pesquisadores possuem acesso ao alvo principal da radiação (por exemplo, acesso direto aos pulmões no caso de estudos *in vivo* em algumas espécies) para investigar os efeitos diretamente no local onde a radiação incidiu, ou se utilizarão uma abordagem sistêmica. Por exemplo, um estudo com camundongos conduzido por Nie e colaboradores descreveram uma correlação direta entre 8-OHdG do tecido pulmonar e valores crescentes de exposição ao Rn (NIE *et al.*, 2012). Mas no caso de se escolher um modelo de abordagem sistêmica, como no presente trabalho, é adicionado nas análises a perspectiva de células que não sofreram a incidência da RI diretamente e, portanto, podem apresentar respostas metabólicas distintas, uma vez que estão sob influência de outros fatores (MANCUSO *et al.*, 2012; NIKITAKI *et al.*, 2017; KANAGARAJ *et al.*, 2019). Esta questão acrescenta variabilidade nos resultados e requer uma análise cuidadosa com outras variáveis que possam interferir nas concentrações do biomarcador escolhido. Portanto, ainda é difícil encontrar resultados concordantes em se tratando de pesquisas com seres humanos, devido à complexidade do conjunto de exposições ambientais, ocupacionais e estilo de vida, e aos diferentes níveis de exposição à radiação ionizante, como os mencionados anteriormente nas comparações com outras pesquisas.

A 8-OHdG urinária é considerada um biomarcador sistêmico porque uma vez que é coletada na urina, representa uma média do metabolismo oxidativo de todos os órgãos do ser humano e, neste aspecto, órgãos pequenos que estejam sob influência de um desequilíbrio redox contribuem muito pouco para que um aumento significativo de 8-oxoguanosina seja detectado na urina. Assim como o inverso também é verdadeiro, ou seja, órgãos de tamanho considerável que estejam sofrendo estresse oxidativo contribuem mais para um aumento do analito em questão (POULSEN *et al.*, 2014). Logo, como o pulmão é considerado um dos maiores órgãos do ser humano (MURRAY, 2010), pode ser criada uma hipótese de que as alterações nas concentrações de 8-OHdG urinária

encontradas no presente trabalho possam refletir, pelo menos em parte, um aumento nos níveis de oxidação derivado dos pulmões dos indivíduos expostos a altos níveis de Rn interior.

Ao contrário das variáveis que não se relacionaram significativamente com a 8-oxoguanosina, o polimorfismo Ser326Cys na enzima OGG1, a qual está diretamente responsável em reparar danos oxidativos no ADN, obteve associação significativa com mudanças nas concentrações de 8-OHdG. Participantes homocigotos (Ser/Ser) obtiveram concentrações até 2,4 vezes maiores de 8-OHdG em comparação com os heterocigotos (Ser/Cys). Este efeito, porém, só foi observado quando levado em consideração os níveis mais altos do gás Rn (a partir de 145 Bq/m³). Em pessoas que possuem ambos os alelos selvagens, a enzima OGG1 funciona normalmente, e possui eficiência maior do que a enzima mutante (Ser/Cys) de remover a guanina oxidada do genoma (LUNA *et al.* 2005; SMART; CHIPMAN; HODGES, 2006; ROSZKOWSKI *et al.* 2011). Logo, os resultados obtidos no presente estudo podem significar que (I) nos participantes homocigotos Ser326Ser, as altas concentrações de 8-oxoguanosina seja devido à maior eficiência da enzima OGG1 em remover as guaninas oxidadas quando comparada com a enzima mutante Ser326Cys. (II) Inversamente, os indivíduos heterocigotos tiveram menores concentrações de 8-OHdG na urina, pois possuem menor capacidade de eliminação das guaninas oxidadas e, possivelmente, elas permanecem no próprio genoma e nas reservas de nucleotídeos trifosfatados. (III) A exposição crônica a elevados níveis de Rn interior pode provocar um aumento significativo no estado oxidativo geral do organismo, ao ponto dos produtos metabólicos de vias antioxidantes, que ocorrem no núcleo para remoção de bases oxidadas, serem detectados na urina como 8-OHdG. (IV) O polimorfismo analisado em OGG1 pode ser um fator contribuinte para proteção do genoma contra os efeitos indiretos da RI, especialmente quando a mesma alcança níveis mais elevados no ambiente.

Tal associação do polimorfismo como um fator contribuinte para o processo de respostas adaptativas à radiação ionizante também foi encontrada no trabalho de Toprani e Das (2020), os quais utilizaram distintas doses de radiação gama na exposição de células mononucleares do sangue periférico de doadores humanos. Os autores concluíram que dentre os “doadores

adaptativos”, houve uma redução significativa de danos no genoma, medido pela porcentagem de ADN na cauda do cometa (ensaio de eletroforese de célula única) nos indivíduos Ser326Ser (CC); como também houve diferenças na expressão de ARN mensageiro do gene *hOGG1* entre os doadores que possuíam pelo menos um alelo mutante (326Cys) (TOPRANI; DAS, 2020). Apesar da diferença no número de doadores recrutados, do tipo de radiação e a frequência de exposição serem diferentes entre este e o presente trabalho, pode-se chegar em um raciocínio similar ao que os autores mencionados acima encontraram. Eles ainda discutem sobre outros polimorfismos e outros genes envolvidos no reparo do DNA que também atuam na resposta a danos induzidos pela radiação, formando uma hipótese na qual cada variável (polimorfismos genéticos, modificações pós-traducionais, entre outras) exerce pequenas contribuições que culminam em uma resposta final de reparo dos danos no ADN, que pode apresentar eficácias distintas dependendo das variações em cada fator considerado. Seria necessário conduzir mais pesquisas com a população-alvo a fim de investigar o nível de influência destes outros possíveis fatores envolvidos direta ou indiretamente com o metabolismo oxidativo do genoma.

Em se tratando das demais análises realizadas neste estudo, a aplicação de métodos do campo da epigenética na avaliação do risco da exposição ambiental ao Rn interior na população é uma ideia ainda muito recente. As publicações na literatura que investigaram a metilação do ADN (global e/ou em genes específicos) associada com exposição à radiação ionizante foram obtidas com diferentes tipos de emissões – raios X, radiação gama, íons pesados – e em modelos distintos, como cultivo de células *in vitro*, *in vivo* com camundongos ou com indivíduos expostos ocupacionalmente (KOTURBASH *et al.*, 2006; PRIOR *et al.*, 2016; MIOUSSE; KUTANZI; KOTUBARSH, 2017; WU *et al.*, 2014; AYPAR; MORGAN; BAULCH, 2011; BAULCH *et al.*, 2014; ANTWIH *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2019; GOETZ; MORGAN; BAULCH, 2011; HUANG *et al.*, 2017; MAIERHOFER *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2014). Devido a essas diferenças no tipo, doses e frequências de exposição à radiação ionizante, além dos distintos modelos empregados nas pesquisas, pode ser afirmado que ainda não há um consenso sobre qual é o efeito da radiação ionizante na modulação das marcas epigenéticas no ADN.

Segundo a revisão feita para este trabalho, foi encontrado apenas um estudo publicado sobre epigenética e exposição ambiental ao Rn: Vocht e colaboradores mediram a metilação do ADN a nível amplo no genoma a partir de amostras sanguíneas de crianças e mulheres de um subgrupo do estudo de *cohort* da *Avon Longitudinal Study of Parents and Children*. Os autores encontraram tendência de hipometilação em apenas um *locus* nas amostras de sangue periférico de mulheres grávidas, mas não em mulheres de outras idades; e por outro lado, observaram tanto hipo- quanto hipermetilação em *locus* distintos nas amostras sanguíneas de crianças de diferentes idades, incluindo recém-nascidas, 7 anos e 15 a 17 anos. Estes resultados foram observados apenas nos indivíduos expostos a níveis acima de 200 Bq/m³ de Rn interior, os quais abrangeram cerca de 20% da amostra estudada pelos pesquisadores (VOCHT *et al.*, 2019).

Já no presente estudo, foi obtido uma tendência à hipermetilação das sequências LINE-1 nas células sanguíneas dos participantes. Este efeito foi significativamente associado à exposição não somente ao Rn interior, como também a outros fatores – concentração de chumbo sanguíneo e sexo dos indivíduos. Já vem sendo amplamente pesquisado e descrito na literatura que a metilação do ADN pode sofrer variações segundo o tipo celular analisado, o tempo em que se coleta a amostra e as exposições ambientais (LAW; HOLLAND, 2019; FLANAGAN *et al.* 2015). Os seres humanos possuem uma ampla variedade de situações e atividades nas quais se expõem cotidianamente e/ou ocupacionalmente, resultando num complexo exposoma que influencia seu metabolismo (WILD, 2012; PINO *et al.*, 2017). Logo, torna-se cada vez mais importante quantificar a exposição a outros agentes nos estudos envolvendo epigenética.

Além do radônio interior, outro fator que também foi capaz de promover variações significantes na metilação do ADN foi o sexo. No presente estudo, os indivíduos do sexo feminino apresentaram metilação no LINE-1 significativamente reduzida em comparação com os do sexo masculino, apesar de ser devido à influência do subgrupo feminino do grupo controle. Os artigos da literatura ainda apresentam resultados controversos sobre a associação entre essas duas variáveis (EL-MARRII *et al.* 2007; FIGUEREDO *et al.* 2009; JINTARIDTH; MUTIRANGURA, 2010). Os pesquisadores que reportaram

diferenças entre os sexos, consideraram a hipótese de que o estrogênio e seu receptor poderiam estar relacionados com a regulação da metilação no ADN devido aos resultados obtidos com cultura de células (EL-MAARRII *et al.* 2011). Mesmo com incertezas sobre quais são os mecanismos por trás dos diferentes níveis de metilação do LINE-1 em humanos de sexos distintos, trata-se de uma análise essencial e relevante tanto nas pesquisas que lidam com epigenética, como também especialmente com avaliação de risco a exposições ambientais e/ou ocupacionais a agentes físico-químicos, uma vez que pode servir como base para indicar subgrupos mais vulneráveis à exposição de determinado agente.

A concentração sanguínea de Pb foi outra variável associada à metilação global do genoma representada pelo L1 no presente trabalho. A determinação dos isótopos deste elemento nas amostras de sangue, comparando com a quantificação em amostras ambientais e antropogênicas, poderia indicar se o Pb presente no sangue dos participantes se originou da cadeia de decaimento do urânio – o que caracterizaria uma exposição geogênica natural – ou de outras fontes de exposição (YIP; LAM; TONG, 2008; OULHOTE *et al.* 2011; YOO *et al.* 2014; KATAHIRA *et al.* 2019). Mas considerando que (I) menos de 4% dos participante relataram trabalhar com Pb; (II) menos de 8% dos indivíduos do grupo LP apresentaram concentrações acima do regulado pelo CDC de 5 µg/dL (ATSDR, 2020); e (III) os valores máximos de Pb sanguíneo estarem muito abaixo dos valores relatados na literatura para exposição ocupacional ao Pb (CHWALBA *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2019; NOUIOUI *et al.*, 2019), pode se considerar a hipótese de que as concentrações sanguíneas de Pb obtidas das populações estudadas poderiam refletir uma exposição geogênica a este metal.

Além disso, foi obtida uma associação inversa entre o Pb sanguíneo e a metilação do L1, ou seja, há uma tendência à hipometilação dessas regiões do ADN na medida em que as concentrações de Pb aumentam. Este resultado corrobora com outros estudos publicados na literatura, por exemplo: Li e colaboradores observaram uma diminuição significativa nos níveis de metilação do L1 em um grupo de trabalhadores expostos ao Pb, assim como em um modelo de cultura celular (LI *et al.*, 2013). Devóz e colaboradores também encontraram associação negativa (inversa) entre níveis sanguíneos de Pb e metilação global do genoma em trabalhadores expostos em fábricas de baterias

(DEVÓZ *et al.*, 2017). O mesmo resultado também foi observado quando se analisa o chumbo na patela e tíbia, ossos onde este metal costuma se acumular e, portanto, melhor representa a exposição crônica (efeito acumulativo) (WRIGHT *et al.*, 2010). Além dos exemplos supracitados, vale mencionar que há grande variedade de publicações evidenciando o perfil de alteração epigenética ocasionado pelo Pb, inclusive utilizando modelos distintos de abordagens – humanos, camundongos e peixe-zebra (*Danio rerio*), por exemplo (SANCHEZ *et al.*, 2017; NYE; HOYO; MURPHY, 2015; DOU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2020). A conclusão que esses trabalhos reportam são mudanças do padrão de metilação em genes e tecidos específicos, mas com tendências justamente à hipometilação global do genoma.

O diferencial do presente trabalho foi encontrar tais alterações e associações ocorrendo com indivíduos não expostos ocupacionalmente, ou seja, que apresentam níveis baixos de Pb no sangue derivados provavelmente de exposição ambiental. Este achado é importante pois pode indicar que mesmo quando os níveis de Pb sanguíneo não sejam o suficiente para comprometer os principais órgãos/sistemas-alvo, como a síntese de hemoglobina no sistema hematológico, são o suficiente para provocar uma mudança a nível epigenético nas células do sangue periférico. Ainda há incertezas sobre as possíveis consequências deste achado na saúde dos indivíduos. É cedo para sugerir que estas mudanças epigenéticas poderiam servir como um biomarcador adicional de exposição ao Pb ou como biomarcador de carcinogênese, uma vez que: (I) a medição de Pb no sangue caracteriza uma exposição recente e aguda e, portanto, passível de apresentar flutuações ao longo do tempo (WRIGHT *et al.*, 2010; COLICINO *et al.*, 2019). Estudos adicionais medindo as variações dos níveis de Pb com as mudanças na metilação do ADN em períodos distintos poderiam ser realizadas para verificar mais profundamente a relação temporal entre ambas variáveis; e (II) os estudos da literatura ainda apresentam resultados controversos sobre a associação entre hipometilação global do genoma das células mononucleares do sangue periférico e processos cancerígenos (ARDELJAN *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017; ANN *et al.*, 2018; STURGEON *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; ARAYATAWEEGOOL *et al.*, 2019).

É interessante notar que os fatores associados à metilação do L1, investigados no modelo de regressão, possuem influências distintas sobre essa

marca epigenética. Segundo o modelo proposto, as concentrações de Rn interior possuem relação direta com a %Cm do L1, ou seja, quanto maiores as concentrações deste gás, há maiores chances das citosinas destas sequências gênicas estarem metiladas. Por outro lado, as concentrações sanguíneas de Pb e o fato do indivíduo ser do sexo feminino foram variáveis que correlacionaram inversamente com a metilação de L1, isto é, quanto maiores os níveis de Pb no sangue, menores quantidades de citosinas metiladas nos promotores das sequências L1 poderão ser encontradas. Essa aparente contradição entre a direção de influência das variáveis pode encontrar explicação no fato de que, além da magnitude de associação de cada uma das variáveis serem distintas (estimada pelo coeficiente B), a metilação do ADN é um processo biológico dinâmico, cuja regulação bioquímica está intimamente relacionada a diversos outros fatores, tanto internos como externos, como por exemplo, o nível de atividade das enzimas ADN metiltransferases e outras exposições ambientais/ocupacionais (KAELIN JR.; MCKNIGHT, 2013; TIFFON, 2018; MARTIN; FRY, 2018). Portanto, pode-se levantar a hipótese de que outras variáveis não medidas nesta pesquisa também poderiam estar contribuindo para este processo epigenético dos indivíduos analisados.

De modo geral, a hipermetilação das sequências LINE-1 observada nas células sanguíneas dos residentes de LP pode indicar algumas questões em relação ao genoma dessas células. Primeiramente, é importante notar que a posição das citosinas metiladas avaliadas neste trabalho situam-se no promotor gênico. As sequências LINE-1 geralmente possuem forte metilação justamente em seu promotor com finalidade de silenciar sua expressão, ou seja, para evitar sua transposição para outros lugares no genoma e, conseqüentemente, evitar a instabilidade genômica pela desregulação de expressão de outros genes e pelas quebras da fita dupla do ADN no momento de inserção da nova sequência (GASIOR *et al.* 2006; BECK *et al.* 2011). Por outro lado, se adotada uma perspectiva de que o padrão de 5-mC dessas sequências também serve como indicador de metilação global do genoma, pode ser pensado que outras partes do ADN das células sanguíneas também podem estar com o padrão de metilação alterado de forma a possuir maior quantidade de 5-mC – tanto no promotor, como também em outras partes de um gene. Nesse caso, aumento de 5-mC em promotores de outros genes pode causar a diminuição ou mesmo

inibição de suas expressões; enquanto que um aumento de 5-mC no corpo de um gene pode contribuir para aumentar sua expressão. Essa alteração do padrão de citosinas metiladas pode favorecer, respectivamente, o silenciamento de genes supressores tumorais ou a expressão de proto-oncogenes, evento estes que contribuem com a iniciação e/ou progressão de um processo cancerígeno (ESTÉCIO; ISSA, 2011; HUR et al. 2014; KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2011; MIOUSSE; KOTURBASH, 2015). Experimentos adicionais utilizando outras técnicas de biologia molecular, como o pirosequenciamento, seriam necessários para se investigar mais precisamente a situação de metilação em outras regiões do genoma da população estudada neste trabalho. Como também, a análise de metilação em células sanguíneas como possível biomarcador circulante e precoce de processo carcinogênico ainda é uma questão aberta a investigações, pois a literatura apresenta resultados conflitantes (ARDELJAN et al. 2017).

Além desses pontos discutidos até o momento, uma questão importante a ser levada em consideração neste estudo é que os resultados encontrados se referem a células não expostas diretamente à radiação ionizante. Uma vez que o Rn interior foi uma variável que influenciou em parte a metilação dos genes LINE-1 dessas células, pode-se levantar uma hipótese de que pelo menos parte desta resposta epigenética obtida pode ter sido provocada pelo “efeito não-direcionado” (*non-targeted effects*). Este fenômeno acontece justamente quando células distantes ou passageiras, que não foram atravessadas diretamente pela faixa de radiação ionizante, recebem sinais moleculares de células irradiadas e desenvolvem alterações metabólicas distintas que culminam em instabilidade genômica (MORGAN; SOWA, 2007; NIKITAKI et al. 2016).

Além dos experimentos realizados com amostras biológicas de seres humanos, também foram realizados experimentos *in vitro* a fim de analisar a metilação de L1 em células diretamente expostas à RI de alta TLE, assim como suas células descendentes para investigar o efeito não-direcionado. A falta de significância estatística entre as médias de %Cm de LINE-1 segundo as distintas doses de partículas alfa e geração celular utilizadas neste trabalho pode indicar algumas questões. Primeiramente, a literatura científica já comenta que mudanças na metilação do ADN induzidas pela RI podem variar segundo o tipo celular, doses de exposição e qualidade da radiação emitida – ou seja, a TLE

(MIOUSSE; KUTANZI; KOTURBASH, 2017). Por exemplo: Aypar e colaboradores irradiaram células GM10115 (células híbridas de humano e hamster) com 0,1 e 1 Gy de íons $^{56}\text{Fe}^{+26}$ (TLE de 150 keV/ μm) e também com 0,5 e 2 Gy de raios-X (TLE de 2 keV/ μm). Esses autores verificaram pelo método de análise de restrição combinada por bisulfito, a ocorrência de hipometilação em LINE-1 apenas nas maiores doses de ambas as RI utilizadas. Por outro lado, observaram hipermetilação de L1 nas células expostas a 0,5 Gy de raios-X em comparação com células controle não irradiadas (AYPAR; MORGAN; BAULCH, 2011). Em outro estudo executado por Goetz e colaboradores, foi verificado hipometilação de LINE-1 inclusive em 16-20 populações celulares após as células-mães terem sido irradiadas com 0,1 e 1 Gy de íons ^{56}Fe ; e este resultado foi observado em dois tipos celulares distintos, nas células AG01522D e RKO (GOETZ; MORGAN; BAULCH, 2011).

No presente trabalho foi usada pelo menos uma dose igual à dos estudos citados anteriormente (1 Gy), porém as partículas alfa possuem menor TLE que os íons ferro, apesar de ambas serem consideradas radiação de alta TLE, e as células de todos os estudos são originadas de linhagens distintas. Essas variáveis tornam mais difícil a comparação de trabalhos diferentes, por isso seria necessário a realização de mais pesquisas a respeito da metilação de LINE-1 nos fibroblastos de pulmão humano expostos a outras doses diferentes de partículas alfa, a fim de verificar, por exemplo, se há um limite de dose ainda maior que o testado no presente trabalho, a partir do qual é possível verificar alterações na metilação de L1, ou se a mesma permanece inalterada independente de dose.

Além disso, há uma possibilidade de que as células utilizadas neste estudo sejam mais resistentes a mudanças no padrão de metilação das sequências LINE-1 em comparação com outras linhagens celulares. Possíveis razões para essa característica incluem uma maior expressão de genes envolvidos na regulação da metilação de ADN, por exemplo, os genes codificadores das enzimas ADN metil transferases, assim como maior atividade dessas enzimas no núcleo celular. Há trabalhos na literatura que demonstram em outros tipos celulares que o perfil de metilação de L1, e mesmo de outros genes específicos, não se altera após tratamento com distintos agentes, como os próprios inibidores de metilação (5-aza-2'-deoxicitidina, por exemplo) e até

mesmo alguns tipos de RI de alta TLE (GOETZ; MORGAN; BAULCH, 2011; MIOUSSE; KUTANZI; KOTURBASH, 2017; BELLI; TABOCCHINI, 2020). Seguindo raciocínio similar, pode ser também que as doses escolhidas e a TLE das partículas alfa não tenham sido o suficiente para sobrepujar esse possível forte sistema de regulação da metilação em L1 nos fibroblastos de pulmão humano. Esse seria mais um fator para incentivar futuras pesquisas com uma variação maior de doses como mencionado anteriormente.

6. CONCLUSÃO

A exposição crônica a elevados níveis de radônio interior aumentou significativamente as concentrações de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina urinária em habitantes da cidade de Lajes Pintadas, uma área com média-alta radiação natural do nordeste brasileiro. O alelo mutante (326Cys), do polimorfismo Ser326Cys no gene *hOGG1*, contribuiu para diminuir as concentrações do biomarcador de oxidação do genoma excretados na urina. Além disso, a porcentagem de 5-metilcitosinas das sequências LINE-1 foi maior na população exposta a níveis mais altos do gás radioativo. Porém, foi uma marca epigenética influenciada significativamente pela concentração de radônio interior, e também pelos níveis sanguíneos de chumbo e pelo sexo dos participantes da presente pesquisa. Uma vez que a metilação do ADN foi medida em células não diretamente expostas à radiação ionizante, pode ser detectado a ocorrência do efeito não-direcionado da radiação ionizante na população estudada. Ao contrário do estudo com seres humanos, no experimento *in vitro* foi observado que as distintas doses de partículas alfa não alteraram significativamente o padrão de metilação de L1 das culturas de fibroblastos de pulmão humano. Mesmo com essa diferença de resultados entre os experimentos *in vivo* e *in vitro*, é evidente que dependendo da dose, a radiação de alta transferência linear de energia é capaz de provocar instabilidade no genoma por vias oxidativas e epigenéticas.

REFERÊNCIAS

- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 8, p. 487–500, 27 jun. 2016.
- ANGELIM, L. A. A.; MEDEIROS, V. C.; NESI, J. R. Projeto Geologia e Recursos Minerais do Estado do Rio Grande do Norte. Mapa geológico do Estado do Rio Grande do Norte. Escala. 1:500.000. Recife: CPRM/FAPERN 2006.
- ANTWIH, D. A. et al. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. **Epigenetics**, v. 8, n. 8, p. 839-848, 2013.
- APKIN, R. Social Security and Public Health: is Radiation a Threat or a Benefit?. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 149, p. 59-64, 2014.
- ARAYATAWEEGOOL, A. et al. Head and neck squamous cell carcinoma drives long interspersed element-1 hypomethylation in the peripheral blood mononuclear cells. **Oral Disease**, v. 25, n. 1, p. 64-72, 2019.
- ARDELJAN, D. et al. The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. **Clinical Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 816–822, 1 abr. 2017.
- ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Lead. Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=96&tid=22>> Acessado em fevereiro de 2020.
- AYPAR, U.; MORGAN, W. F.; BAULCH, J. E. Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 707, p. 24-33, 2011.
- AZZAM, E. I.; JAY-GERIN, J.-P.; PAIN, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer Letters**, v. 327, n. 1-2, p. 48–60, dez. 2012.
- BAIN, B.; BATES, I.; LAFFAN, M. Dacie and Lewis Practical Haematology. 12^a edição. **Elsevier**, 2016.
- BAKER, J. E.; MOULDER, J. E.; HOPEWELL, J. W. Radiation as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1945–1956, out. 2011.
- BAULCH, J. E. Genetic and Epigenetic Changes in Chromosomally Stable and Unstable Progeny of Irradiated Cells. **Plos One**, v. 9, n. 9, 2014.
- BEARD, W. A.; BATRA, V. K.; WILSON, S. H. DNA polymerase structure-based insight on the mutagenic properties of 8-oxoguanine. **Mutation**

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 703, n. 1, p. 18–23, nov. 2010.

BECK, C. R. et al. LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 12, n. 1, p. 187–215, 2011.

BELLI, M.; TABOCCHINI, M. A. Ionizing Radiation-Induced Epigenetic Modifications and Their Relevance to Radiation Protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1-34, 2020.

BOITEUX, S.; RADICELLA, J. P. The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 377, n. 1, p. 1–8, maio 2000.

CADET, J. et al. Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. **Free Radical Research**, v. 46, n. 4, p. 367–381, 2012.

CAMPOS, T. F. C. et al. O gás radônio e a radiação natural em terrenos metagraníticos e pegmatíticos: o caso do município de Lages Pintadas (Rio Grande do Norte, Brasil). **Revista de Geologia**, v. 26, n. 2, p. 45-52, 2013.

Cayman Chemical. ELISA (Competitive) Analysis Tools. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/analysisTools/elisa>> Acessado em março de 2016.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235–263, 2017.

CHAVES, L. C. C. et al. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 7572-7581, 2016.

CHEN, B. et al. The relationship among occupational irradiation, DNA methylation status, and oxidative damage in interventional physicians. **Medicine**, v. 98, n. 39, 2019.

CHEN, Y. et al. Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 46, p. 2844-2872, 2017.

CHWALBAA, A. et al. The effect of occupational chronic lead exposure on the complete blood count and the levels of selected hematopoietic cytokines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 355, p. 174-179, 2018.

COLICINO, E. et al. Blood DNA methylation biomarkers of cumulative lead exposure in adults. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, 2019.

COLLIGNAN, B.; LE PONNER, E.; MANDIN, C. Relationships between indoor radon concentrations, thermal retrofit and dwelling characteristics. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 165, p. 124–130, dez. 2016.

D'AUGUSTIN, O. et al. Lost in the Crowd: How Does Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 (OGG1) Find 8-Oxoguanine in the Genome? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8360, 7 nov. 2020.

DABIN, J.; FORTUNY, A.; POLO, S. E. Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. *Cell*, v. 62, p. 712-727, 2016.

DANTAS, R. C. et al. Natural radioactivity in Brazil: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 143-157, 2020.

DANTAS, S. R. C. et al. Uso da Ecotoxicologia na Investigação da Toxicidade Associada à Radiação Natural no Açude Riacho da Cachoeira, Região do Semiárido/Brasil. **Revista de Geologia**, v. 26, n. 2, p. 109-119, 2013.

DARBY, S. et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. **BMJ**, v. 330, n. 7485, p. 223, 2004.

DAVIS, A. et al. No association between global DNA methylation in peripheral blood and lung cancer risk in nonsmoking women: results from a multicenter study in Eastern and Central Europe. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 27, n. 1, p. 1–5, 2018.

DELANEY, S. et al. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. **Free Radical Research**, v. 46, n. 4, p. 420–441, 2012.

DEVÓZ, P. P. Lead (Pb) exposure induces disturbances in epigenetic status in workers exposed to this metal. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 19-21, p. 1098-1105, 2017.

DOU, J. F. et al. Perinatal Lead (Pb) Exposure and Cortical Neuron-Specific DNA Methylation in Male Mice. **Genes**, v. 10, n. 4, 2019.

DUAN, W.-X. et al. The Association between OGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis of 27 Studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35970, 23 abr. 2012.

EL-MAARRI, O. et al. Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males. **Human Genetics**, v. 122, n. 5, p. 505-514, 2007.

EL-MAARRI, O. et al. Methylation at Global LINE-1 Repeats in Human Blood Are Affected by Gender but Not by Age or Natural Hormone Cycles. **Plos One**, v. 6, n. 1, 2011.

Environment Protection Agency (EPA). Radiation Sources and Doses. Disponível em: <<https://www.epa.gov/radiation/radiation-sources-and-doses#tab-1>>. Acessado em janeiro de 2018.

ESTÉCIO, M. R. H.; ISSA, J. P. J. Dissecting DNA hypermethylation in cancer. **FEBS Letters**, v. 585, p. 2078-2086, 2011.

FIGUEIREDO, J. C. et al. Global DNA Hypomethylation (LINE-1) in the Normal Colon and Lifestyle Characteristics and Dietary and Genetic Factors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 2009.

FLANAGAN, J. M. et al. Temporal Stability and Determinants of White Blood Cell DNA Methylation in the Breakthrough Generations Study. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 24, n. 1, p. 221-229, 2015.

FLUNKERT, J. et al. Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 370, n. 2, p. 322–332, 2018.

GARCIA, A. C. F. S. et al. Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 3329-3335, 2011.

GASIOR, S. L. et al. The Human LINE-1 Retrotransposon Creates DNA Double-strand Breaks. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 5, p. 1383-1393, 2006.

GENG, P.; YAO, J.; ZHU, Y. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p. 2299–2306, 2014.

GOETZ, W.; MORGAN, M. N. M.; BAULCH, J. E. The Effect of Radiation Quality on Genomic DNA Methylation Profiles in Irradiated Human Cell Lines. **Radiation Research**, v. 175, p. 575-587, 2011.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635–638, 2007.

GRUBER, V. et al. The European map of the geogenic radon potential. **Journal of Radiological Protection**, v. 33, p. 51-60, 2013.

GUO, C. et al. Association between Oxidative DNA Damage and Risk of Colorectal Cancer: Sensitive Determination of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2 set. 2016.

HAMZA, V. Z. 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.

HEERAN, A. B. et al. Radiation-induced Bystander Effect (RIBE) alters mitochondrial metabolism using a human rectal cancer ex vivo explant model. **Translational Oncology**, v. 14, n. 1, p. 100882, 2021.

HU, Y. C.; AHRENDT, S. A. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and G:C-to-T:A mutations: No evidence for a role in tobacco-related non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 3, p. 387-393, 2005.

HUANGA, H. et al. Aberrant DNA methylation in radon and/or cigarette smoke-induced malignant transformation in BEAS-2B human lung cell line. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, 2017.

HUR, K. et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto- oncogenes in human colorectal cancer metastasis. **Gut**, v. 63, p. 635-646, 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e Estados - Lajes Pintadas. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rn/lajes-pintadas.html>> Acessado em outubro de 2020.

Instituto Nacional de Câncer. Atlas On-line de Mortalidade. Disponível em <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo06/consultar.xhtml>> Acessado em maio de 2017.

International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Disponível em: <<https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>> Acessado em janeiro de 2018.

JANIK, J. et al. 8-Oxoguanine incision activity is impaired in lung tissues of NSCLC patients with the polymorphism of OGG1 and XRCC1 genes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 709-710, p. 21–31, 2011.

JIANG, Y. et al. The role of TGF- β 1–miR-21–ROS pathway in bystander responses induced by irradiated non-small-cell lung cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 4, p. 772–780, 2014.

JINTARIDTH, P.; MUTIRANGURA, A. Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. **Physiological Genomics**, 2010.

KAELIN JR., W. G.; MCKNIGHT, S. L. Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. **Cell**, v. 153, n. 1, p. 56-69, 2013.

KANAGARAJA, K. et al. Primary and secondary bystander effect and genomic instability in cells exposed to high and low linear energy transfer radiations. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 12, p. 1648-1658, 2019.

KATAHIRA, K. et al. Two-step Extraction Method for Lead Isotope Fractionation to Reveal Anthropogenic Lead Pollution. **Environ Technol.**, v. 40, n. 26, p. 3473-3478, 2019.

KITKUMTHORN, N.; MUTIRANGURA, A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. **Clinical Epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 315-330, 2011.

KOTURBASH, I. et al. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v. 66, n. 2, p. 327-330, 2006.

KREWSKI, D. et al. Residential Radon and Risk of Lung Cancer: A Combined Analysis of 7 North American Case-Control Studies. **Epidemiology**, v. 16, n. 2, p. 137-145, 2005.

KUMAR, A. et al. Role of OGG1 Ser326Cys polymorphism and 8-oxoguanine DNA damage in risk assessment of squamous cell carcinoma of head and neck in north Indian population. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 2, p. 227–233, 2011.

L'ANNUNZIATA, M. F. Radioactivity - Introduction and History, From the Quantum to Quarks. 2^a edição. Elsevier, 2016.

LANGE, N. E. et al. Alu and LINE-1 methylation and lung function in the normative ageing study. **BMJ Open**, v. 2, n. 5, p. e001231, 2012.

LAW, P-P; HOLLAND, M. L. DNA methylation at the crossroads of gene and environment interactions. **Essays in Biochemistry**, v. 63, n. 6, p. 717-726, 2019.

LENG, S. et al. Genetic variation in SIRT1 affects susceptibility of lung squamous cell carcinomas in former uranium miners from the Colorado plateau. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 5, p. 1044–1050, 2013.

LI, C. et al. Epigenetic marker (LINE-1 promoter) methylation level was associated with occupational lead exposure. **Clinical Toxicology**, v. 51, p. 225–229, 2013.

LIMA, F. et al. High LET 56Fe Ion Irradiation Induces Tissue-Specific Changes in DNAMethylation in the Mouse. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, p. 266-277, 2014.

LITTLE, M. P. et al. Review and meta-analysis of epidemiological associations between low/moderate doses of ionizing radiation and circulatory disease risks, and their possible mechanisms. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 49, n. 2, p. 139–153, 2010.

LUNA, L. et al. Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys326 polymorphic variant. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 6, p. 1813-1824, 2005.

MAIERHOFER, A. et al. Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation. **Plos One**, v. 12, n. 5, p. 1-15, 2017.

MANCUSO, M. et al. The Radiation Bystander Effect and its Potential Implications for Human Health. **Current Molecular Medicine**, v. 12, p. 613-624, 2012.

MARCON, A. E. et al. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p.773-780, 2010.

MARCON, A. E. et al. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v. 167, p. 36-43, 2017.

MARTIN, E. M.; FRY, R. C. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. **Annual Review of Public Health**, v. 39, n. 1, p. 309–333, 2018.

MENEZES-FILHO, J. A.; VIANA, G. F. S.; PAES, C. R. Determinants of lead exposure in children on the outskirts of Salvador, Brazil. **Environmental Monitoring Assessment**, [S.l.], v. 184, p. 2593-2603, 2012.

MESAROS, C. et al. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine as a biomarker of tobacco-smoking-induced oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 3, p. 610–617, 2012.

Mini Physics. The Electromagnetic Spectrum. Disponível em: <https://www.miniphysics.com/electromagnetic-spectrum_25.html>. Acessado em outubro de 2020.

MIOUSSE, I. R.; KOTURBASH, I. The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

MIOUSSE, I. R; KUTANZI, K. R; KOTURBASH, I. Effects of ionizing radiation on DNA methylation: from experimental biology to clinical applications. **International Journal Of Radiation Biology**, v. 93, n. 5, p. 457-469, 2017.

MOORE, S.; STANLEY, F. K. T.; GOODARZI, A. A. The repair of environmentally relevant DNA double strand breaks caused by high linear energy transfer irradiation – No simple task. **DNA Repair**, v. 17, p. 64–73, 2014.

MORGAN, W. F.; SOWA, M. B. Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 616, n. 1-2, p. 159-164, 2007.

MURRAY, J. F. The structure and function of the lung. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 4, p. 391-396, 2010.

Nacional Council on Radiation Protection and Measurements (NCRP). NCRP Report 160. Disponível em: <<https://ncrponline.org/publications/reports/ncrp-report-160-2/>>. Acessado em janeiro de 2018.

NETI, P. V. S. V. et al. A Multi-port Low-Fluence Alpha-Particle Irradiator: Fabrication, Testing and Benchmark Radiobiological Studies. **Radiation Research**, v. 161, p. 732-738, 2004.

NEUGEBAUER, T. et al. Radon emission rate and analysis of its influencing parameters. **Nukleonika**, v. 61, n. 3, p. 337-342, 2016.

NIE, J-H. et al. Oxidative Damage in Various Tissues of Rats Exposed to NIKITAKI, Z. et al. Bridging Plant and Human Radiation Response and DNA Repair through an In Silico Approach. **Cancers**, v. 9, n. 6, 2017.

NIKITAKI, Z. et al. Measurement of complex DNA damage induction and repair in human cellular systems after exposure to ionizing radiations of varying linear energy transfer (LET). **Free Radical Research**, v. 50, n. 51, S64-S78, 2016.

NOUIOUI, M. A. et al. Biomonitoring chronic lead exposure among battery manufacturing workers in Tunisia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7980-7993, 2019.

NYE, M. D.; HOYO, C.; MURPHY, S. K. In vitro lead exposure changes DNA methylation and expression of IGF2 and PEG1/MEST. **Toxicology in Vitro Journal**, v. 29, n. 3, p. 544-550, 2015.

Organização Mundial de Saúde (OMS). WHO handbook on indoor radon: a public health perspective. **WHO Press**, 2009.

OULHOTE, Y. et al. Identification of Sources of Lead Exposure in French Children by Lead Isotope Analysis: A Cross-Sectional Study. **Environmental Health**, v. 10, n. 75, 2011.

PARK, K. et al. Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inflammatory response, oxidative defense, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 224, 2020.

PINO, A. et al. Human biomonitoring data analysis for metals in an Italian adolescents cohort: An exposome approach. **Environmental Research**, v. 159, p. 344-354, 2017.

POULSEN, H. E. et al. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 801-808, 2014.

PRIOR, S. et al. Densely ionizing radiation affects DNA methylation of selective LINE-1 elements. **Environmental Research Journal**, v. 150, p. 470-481, 2016. QING, X. et al. Prognostic significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in solid tumors: a meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 24 out. 2019.

QU, W. et al. Effects of oxidative stress on blood pressure and electrocardiogram findings in workers with occupational exposure to lead. **The Journal of international medical research**, v. 47, n. 6, p. 2461-2470, 2019.

REISZ, J. A. et al. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 2, p. 260–292, 2014.

ROSZKOWSKI, K. et al. Oxidative damage DNA: 8-oxoGua and 8-oxodG as molecular markers of cancer. **Med Sci Monit**, v. 17, n. 6, p. 329-333, 2011.

SAMET, J. M. Radiation and cancer risk: a continuing challenge for epidemiologists. **Environmental Health**, v. 10, Supl. 1, p. 4, 2011.

SANCHEZ, O. F. et al. Lead (Pb) exposure reduces global DNA methylation level by non-competitive inhibition and alteration of DNMT expression. **Metallomics**, v. 9, n. 2, p. 149-160, 2017.

SILVA, N. C. et al. Towards a Brazilian radon map: consortium radon Brazil. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 160, n. 1-3, p. 226-230, 2014.

SKEPPSTROM, K.; OLOFSSON, B. Uranium and radon in groundwater - An overview of the problem. **European Water**, v. 17, n. 18, p. 51-62, 2007.

SMART, D. J.; CHIPMAN, J. K.; HODGES, N. J. Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine. **DNA Repair**, v. 5, n. 11, p. 1337-1345, 2006.

SPERATI, A. et al. Exposure to Indoor Background Radiation and Urinary Concentrations of 8-Hydroxydeoxyguanosine, a Marker of Oxidative DNA Damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 3, 1999.

STURGEON, S. R. et al. White blood cell DNA methylation and risk of breast cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO). **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 94, 2017.

TAKATA, H. et al. Chromatin Compaction Protects Genomic DNA from Radiation Damage. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013.

TAUHATA, L. et al. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. Rio de Janeiro: 2014.

TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3425, p. 1-19, 2018.

TOPRANI, S. M; DAS, B. Radio-adaptive response of base excision repair genes and proteins in human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. **Mutagenesis**, v. 30, p. 663-676, 2015.

UK Health Security Agency. UK maps of radon. Disponível em: <<https://www.ukradon.org/information/ukmaps>>. Acessado em janeiro de 2018.

United States Environmental Protection Agency. Publications about Radon. Disponível em: <<https://www.epa.gov/radon/publications-about-radon>>. Acessado em maio de 2016.

United States Environmental Protection Agency. Radionuclide Basics: Radon. Disponível em: <<https://www.epa.gov/radiation/radionuclide-basics-radon>>. Acessado em janeiro de 2019.

United States Environmental Protection Agency. State Maps of Radon Zones. Disponível em: <<https://www.epa.gov/radon/state-maps-radon-zones>>. Acessado em janeiro de 2018.

VAN LOON, B.; MARKKANEN, E.; HÜBSCHER, U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair**, v. 9, n. 6, p. 604–616, jun. 2010.

VERÇOSA, C. J. et al. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 148-153, 2017.

VOCHT, F. et al. Residential exposure to radon and DNA methylation across the lifecourse: an exploratory study in the ALSPAC birth cohort. **Wellcome Open Research**, v. 4, n. 3, 2019.

VODICKA, P. et al. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 657–664, 18 ago. 2007.

WANG, B. H. et al. Gene methylation as a powerful biomarker for detection and screening of non-small cell lung cancer in blood. **Oncotarget**, v. 8, p. 31692-31704, 2017.

WANG, K. et al. Tissue- and Sex-Specific DNA Methylation Changes in Mice Perinatally Exposed to Lead (Pb). **Frontiers in Genetics**, v. 21, 2020.

WEAVER, D. et al. Cytogenetic and molecular genetic analysis of tumorigenic human bronchial epithelial cells induced by radon alpha particles. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 6, p. 1251–1257, 1 jun. 1997.

WEI, B. et al. The Effect of hOGG1 Ser326Cys Polymorphism on Cancer Risk: Evidence from a Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27545, 17 nov. 2011.

WILD, C. P. The exposome: from concept to utility. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 24-32, 2012.

WILLIAMSON, A. K.; ZHU, Z.; YUAN, Z. M. Epigenetic mechanisms behind cellular sensitivity to DNA damage. **Cell Stress**, v. 2, n. 7, p. 176-180, 2018.

World Nuclear Association. Naturally-Occurring Radioactive Materials (NORM). Atualizado em Abril 2020. Disponível em: <<https://world-nuclear.org/information-library/safety-and-security/radiation-and-health/naturally-occurring-radioactive-materials-norm.aspx>>. Acesso em: Janeiro de 2021.

World Nuclear Association. Nuclear Radiation and Health Effects. Atualizado em Março de 2021. Disponível em: <<http://www.world-nuclear.org/information-library/safety-and-security/radiation-and-health/nuclear-radiation-and-health-effects.aspx>>. Acessado em maio de 2021.

WRIGHT, R. O. et al. Biomarkers of Lead Exposure and DNA Methylation within Retrotransposons. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 6, p. 790-795, 2010.

WU, C. et al. Radon-induced demethylation of Cdk2 CpG island in the rat lung. **Genes and Genomics**, v. 36, p. 763-770, 2014.

XIAO-JIE, L. et al. LINE-1 in cancer: multifaceted functions and potential clinical implications. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 431–439, 2016.

YAMANE, A. et al. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1689–1694, 2004.

YANG, A. S. et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. 38e38, 2004.

YANG, J. et al. Radon exhalation from soil and its dependence from environmental parameters. **Radiation Protection Dosimetry**, 2017.

YANXIAO, G. et al. Changes of 8-OHdG and TrxR in the Residents Who Bathe in Radon Hot Springs. **Dose-Response: An International Journal**, v. 17, n. 1, 2019.

YIN, X. et al. Radiation quality-dependence of bystander effect in unirradiated fibroblasts is associated with TGF- β 1-Smad2 pathway and miR-21 in irradiated keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 16 jun. 2015.

YIP, Y-C; LAM J. C. W; TONG, W-F. Applications of lead isotope ratio measurements. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 460-480, 2008.

YOO, E-J. et al. Tracing lead pollution sources in abandoned mine areas using stable Pb isotope ratios. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p.781–789, 2014.

ZHOU, P.-T. et al. A systematic review and meta-analysis of the association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and cancers. **Medical Oncology**, v. 32, n. 2, 15 jan. 2015.

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA/GENOTOX



QUESTIONÁRIO

Entrevistador: _____

Nome: _____

Código: _____

Endereço: _____

Tel.: _____

1. Idade: _____ 2. Peso: _____ (kg) 3. Altura: _____ (cm) 4. Sexo: () Masc. () Fem.

5. Natural: () Lajes Pintadas () Santa Cruz () Outro: _____

6. Grupo étnico: () Branco () Pardo () Negro () Amarelo () Indígena

7. Nacionalidade: () Brasil () Outro: _____

8. Estado civil: () Casado () Separado () Solteiro () Viúvo

9. O conjugue é parente? () Sim () Não

10. Filhos: () Sim () Não

11. Quantos filhos: homem _____ mulher _____ (total: _____)

12. Quanto tempo reside na cidade: _____ anos

13. Escolaridade: () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
() 2º grau completo () Superior incompleto () Superior completo () Pós-graduado () Analfabeto

14. Trabalha atualmente? () Sim () Não

15. Tipo de trabalho: () Agricultor () Pescador () Dona de casa () Estudante
() Não se aplica () Outro: _____

16. Trabalha com produtos químicos? () Sim () Não

17. Que produto/s químico/s? _____

18. Utiliza equipamento de segurança no trabalho: () Sim () Não () Não se aplica

19. Descrição do equipamento (luvas, máscara etc.): _____

20. Consume bebida alcoólica: () Às vezes () Sempre () Nunca

21. Nº de copos de bebida alcoólica que consome por semana: _____

22. Tipo de bebida alcoólica ()Cerveja ()Cachaça ()Vodka ()Vinho
()Outro_____
23. Fuma? ()Sim ()Não ()Já fumei
24. Por quanto tempo fuma/fumou? _____anos
25. Quanto fuma/fumava?: ()Menos de uma carteira ()1-2 carteiras ()Mais de 2 carteiras
26. Prática exercício físico? ()Sim ()Não
27. Frequência por semana que pratica: _____ vezes por semana.
28. Quantas refeições faz por dia? _____
29. Ingere frutas e verduras? ()Sim ()Não
30. Quantas vezes por semana? _____ vezes.
31. Conhece a procedência dos produtos? ()Local ()De outras localidades
()Não sabe
32. Consome carne bovina? ()Sim ()Não
33. Quantas vezes por semana? _____ vezes.
34. Conhece a procedência dos produtos? ()Local ()De outras localidades
()Não sabe
35. Consome peixe? ()Sim ()Não
36. Quantas vezes por semana? _____ vezes.
37. Conhece a procedência dos produtos? ()Local ()De outras localidades
()Não sabe
38. Fez exame de raio-X nos últimos 12 meses: ()Sim ()Não
39. Tem ou teve câncer: ()Sim ()Não
40. Tipo de câncer: ()Benigno ()Maligno
41. Localização do câncer: ()Mama ()Pele ()Pulmão ()Bexiga ()Ovário ()Rim
()Fígado ()Outro:

42. Utiliza medicamento: ()Sim ()Não
43. Tratamento de qual doença? ()Diabetes ()Hipertensão ()Câncer ()Outra/s:

44. Algum parente tem ou teve câncer: ()Sim ()Não
- 44.1. Se sim, de que tipo? ()Benigno ()Maligno // Localização:

45. Número de pessoas afetadas por câncer na família: _____
46. Grau de parentesco: ()Irmão ()Pai ()Mãe ()Filho ()Avós paternos
()Avó maternos ()Tio
47. Algum parente tem ou teve outra doença de tratamento prolongado? ()Sim ()Não

48. Grau de parentesco: ()Irmão ()Pai ()Mãe ()Filho ()Avós paternos
()Avó maternos ()Tio

49. Conhecimento de alguma má formação na família? ()Sim ()Não

49.1 Se sim, qual?

50. Grau de parentesco: ()Irmão ()Pai ()Mãe ()Filho ()Avós paternos
()Avós maternos ()Tio

51. Histórico de aborto espontâneo: ()Sim ()Não ()Não se aplica

51.1 Se sim, quantos? _____

52. Você se preocupa com o meio ambiente? ()Sim ()Às vezes ()Nunca/Não

53. O ambiente onde você mora é saudável para viver? ()Sim ()Não

54. Por quê?

55. Nos últimos anos percebeu algum tipo de maus tratos no meio ambiente que fosse prejudicial para a saúde? ()Sim ()Não

56. Descreva qual/is?

57. Conhece algum problema de contaminação natural ou gerada pela atividade das pessoas no local? ()Sim ()Não Qual?

58. Que tipo de água você bebe? ()Torneira ()Engarrafada ()Perfuração ()Outra: _____

58.1. Por quê?

59. Considera que a água que você toma é boa para sua saúde? ()Sim ()Não

60. Na sua casa quantas pessoas dormem por quarto? _____

61. Sua moradia é de que tipo? ()Aluga um quarto ()Casa ()Apartamento ()Outra

62. O banheiro de sua casa tem vaso sanitário? ()Sim ()Não

63. Todas as crianças, entre 6 e 12 anos, que moram com você frequentam a escola? ()Sim ()Não // Quantas? _____

64. Na sua casa a pintura das paredes esta em boas condições? ()Sim ()Não

65. Na sua casa as paredes estão pintadas? ()Sim ()Não

66. Na sua casa tem água de torneira? ()Sim ()Não

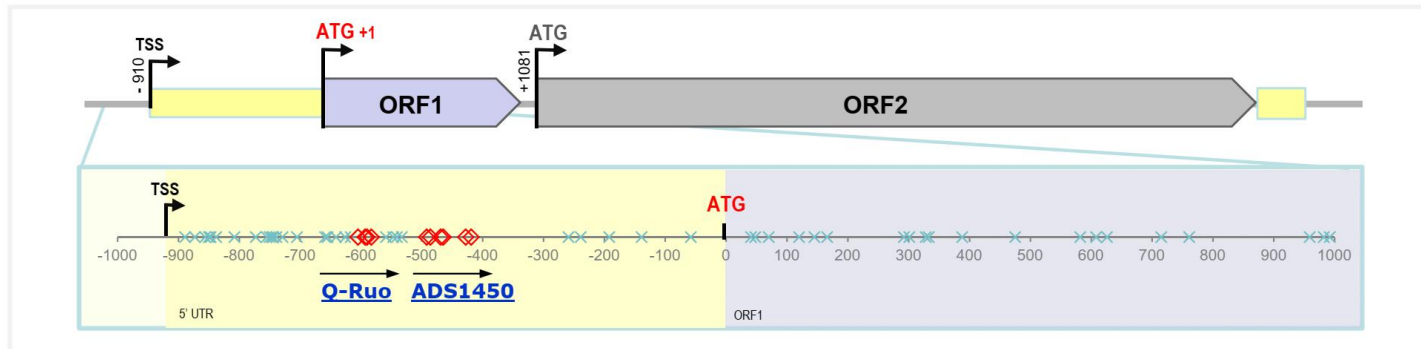
67. Sua casa tem passado por reformas (ampliações, concertos etc.)? ()Sim
()Não
68. O material de construção utilizado na sua casa foi obtido de Lajes Pintadas?
(areia, pedras...) ()Sim ()Não
69. O encanamento de sua casa é? ()Metálico ()Plástico
70. Você trabalha em sua casa com chumbo? ()Sim ()Não

ANEXO A

Human LINE1 Retrotransposable Element 1

Also Known As: Line 1; L1.2; LRE1; L1RE1
 GenBank Ascension ID, [M80343](#)
 Sequence Length: 6050 bp, 1665 aa

Major Features:
 ORF1 – 348 aa – encodes a 40 kDa product
 ORF2 – 1317 aa – encodes a reverse transcriptase domain & endonuclease
 Details available at [M80343](#)



Key

TSS : Transcriptional Start Site	× : CpG site not analyzed	* : Alternative TSS (Protein Coding)
TSS : Alternative Transcriptional Start Site	+ : SnP analyzed	
ATG : Translational Start Codon	// : Break in scale (Large Intronic region)	■ : Exon region
◇ : CpG site analyzed	■ : 5' or 3' (UTR)	