



Ana Sofia Lima Vaz

**Minas de urânio: determinação dos efeitos
genéticos em ambientes contaminados com metais
e radionuclídeos**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Ana Sofia Lima Vaz

Minas de urânio: determinação dos efeitos genéticos em ambientes contaminados com metais e radionuclídeos

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Joana Isabel do Vale Lourenço, Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e da coorientadora Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico esta tese aos meus pais, Anabela e Joaquim, e ao meu namorado, João, pelo apoio incondicional e por estarem sempre comigo quando preciso.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Vogal

Prof. Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira
Professora Auxiliar Com Agregação da Universidade do Porto

Vogal

Doutora Joana do Vale Lourenço
Bolsista de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Durante todo este percurso houve momentos bons e outros menos bons. Em cada um desses momentos muitas foram as pessoas que estiveram presentes. Essas pessoas ajudaram-me não só a derrubar os vários obstáculos que se impuseram, como também me ajudaram a ultrapassar todos os meus medos e aflições.

Quero agradecer à Professora Sónia Mendo por me ter aceite e integrado no seu laboratório (LBM) e neste trabalho que me deu imenso gosto a elaborar.

À Dra. Joana Lourenço, por ter sido o meu braço direito e esquerdo durante todo este percurso. Obrigado por confiares e acreditares em mim, mesmo quando eu própria já não o fazia, pela amizade, pela ajuda, pelos ensinamentos, pela dedicação, por todas as vezes em que arranjaste soluções para os problemas que foram surgindo, por tudo e mais alguma coisa que não me esteja a vir à memória, um sincero obrigado.

Agradeço às novas amizades que fiz, em especial à Teresa, à Beatriz e ao Hugo. Obrigado por todos os momentos ótimos, e cómicos, que passamos. Obrigado pelos conselhos, conversas e pela amizade, um enorme obrigado aos três. Nunca irei esquecer de tudo o que passamos juntos durante este percurso. À Tânia, à Joana Barbosa, à Cláudia e mais recentemente à Diana, obrigado pelas conversas, pelos ensinamentos, pela amizade e pelas brincadeiras.

Agradeço à Tatiana e à Joana por partilharem esta experiência comigo e serem boas amigas e companheiras desde a licenciatura. Levo comigo todo o carinho, preocupação e amizade que me deram e nunca irei esquecer do que passamos juntas durante todo este percurso.

Finalmente, um agradecimento muito especial aos meus pais pelo apoio, carinho, amor, amizade e interesse no meu percurso académico. Obrigado por serem o pilar da minha vida e por nunca duvidarem de mim e das minhas capacidades. Ao João um enorme obrigado pelo amor, pela atenção, pelo carinho, pela paciência e pela compreensão que foram fundamentais durante todo este percurso. Obrigado por fazeres parte da minha vida.

Palavras-chave

Urânio, metais, radionuclídeos, genotoxicidade, biomarcadores, *Oryctolagus cuniculus*.

Resumo

Durante a extração de urânio são gerados volumes consideráveis de resíduos compostos por metais e radionuclídeos. A exposição da população e animais, que habitam nos arredores das minas, a estes resíduos levanta sérias preocupações ambientais e de saúde pública. A população e animais residentes podem estar expostos à radiação e metais através dos próprios resíduos, poeiras radioativas, bem como através da ingestão de alimentos e água contaminados. A exposição a estes contaminantes está ligada a uma série de danos genéticos, como o caso das quebras da cadeia dupla do DNA. A radiação e os metais podem causar diretamente danos na molécula de DNA, como também o podem fazer indiretamente por formação de espécies reativas de oxigénio. Assim sendo, tornou-se crucial o uso de biomarcadores moleculares uma vez que, estes fornecem uma resposta rápida sobre os efeitos moleculares da exposição a estes contaminantes, mesmo que os efeitos sub-letais não se manifestem. Neste trabalho foram analisadas respostas ao nível molecular, em coelhos, com a finalidade de determinar o risco químico e/ou radiológico de águas e alimentos contaminados, provenientes de terrenos nos arredores da mina de urânio da Cunha Baixa. Este trabalho teve como objetivo principal a avaliação de potenciais riscos, associados ao consumo de alimentos e água contaminados, quer para os organismos quer para a população residente na Cunha Baixa. Para tal, foram feitos ensaios de exposição *in situ* com coelhos, sendo que, posteriormente, foram analisadas as alterações da expressão genética, de cinco supressores de tumor e dois oncogenes, como biomarcadores de exposição à radiação e a metais. Os resultados revelaram sobre-expressão não só de supressores de tumor (*ATM*, *GADD45A*, *CDKN1A* e *RB*) como também de oncogenes (*SET* e *FGF2*). Com isto verificou-se que o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é um bom bioindicador, uma vez que: este organismo foi sensível à contaminação, uma vez que foi possível detetar alterações moleculares após a exposição a metais e radionuclídeos; permitiu avaliar possíveis efeitos nos consumidores e extrapolar os possíveis riscos para a saúde humana e dos organismos residentes. Para além disto, este estudo contribuiu para a caracterização de potenciais riscos da exposição a alimentos e água contaminados, evidenciando que os contaminantes têm um grande potencial para causar instabilidade genómica e, conseqüentemente, aumentar o risco do desenvolvimento de doenças genéticas, como o cancro. Posto isto, o presente estudo aponta a mina de urânio da Cunha Baixa, bem como outras áreas onde se procede à extração de minério radioativo, como sendo um risco para a população e organismos residentes.

Keywords

Uranium, metals, radionuclides, genotoxicity, biomarkers, *Oryctolagus cuniculus*.

Abstract

During the extraction of uranium, considerable amounts of residues, made primarily of metals and radionuclides, are generated. The exposure of the local human population and wildlife to these dangerous residues are a serious public and environmental health issue. Living organisms can be exposed to radioactive dust clouds, ingestion of contaminated food and contaminated water. The exposure to these residues seems to be linked to several genetic damages such as, DNA double-strand breaks. The exposure to radiation and metals can cause direct and/or indirect damage to DNA molecules, through the formation of reactive oxygen species. This made imperative the use of molecular biomarkers, because of their rapid and sensitive response to the presence of a contaminant. In this work we examined the molecular response of rabbits with the goal of determining the chemical and/or radiological risk of water and food consumption grown in the soils in and around the Cunha Baixa uranium mine for the residents of the Cunha Baixa village. Tests were conducted in situ with rabbits, and showed that the genetic expression of five suppressor tumor genes and two oncogenes were altered. The results showed the over expression of, not only *ATM*, *GADD45A*, *CDKN1A* and *RB*, but also of the oncogenes *SET* and *FGF2*. These results show that the *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) is a good bioindicator species for the effects of metal and radionuclide exposure, since it was sensitive to the contamination, evidencing molecular alterations after exposure to the residues, granting the possibility to evaluate the effects in consumers and extrapolate possible risks to humans. Furthermore, this study contributed for the characterization of potential risks in the consumption of contaminated food and water, since it showed the capability of these contaminants, in altering and creating genomic instability, increasing the chance of developing genetic diseases such as cancer. In conclusion this study shows that the Cunha Baixa uranium mine, as well as other uranium mining areas are a risk to the organisms and human populations.

Índice Geral

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Urânio	3
1.1.1. Extração e Processamento de Urânio – geração de energia elétrica e produção de combustível.....	4
1.1.2. Extração de Urânio na mina da Cunha Baixa	7
1.1.3. Contaminantes provenientes de resíduos da extração de urânio	10
1.1.3.1. Metais	10
1.1.3.2. Radionuclídeos	12
1.2. Efeitos da exploração de urânio para a saúde humana	16
1.2.1. Efeitos genotóxicos associados à exposição a metais e radionuclídeos.....	19
1.3. Biomarcadores de genotoxicidade	22
1.3.1. Genes supressores de tumor	23
1.3.1.1. Gene Supressor de Tumor “Caretaker”	24
1.3.1.1.1. Gene <i>ATM</i>	24
1.3.1.2. Gene Supressor de Tumor “Gatekeepers”	27
1.3.1.2.1. Gene <i>TP53</i>	27
1.3.1.2.2. Gene <i>RB</i>	29
1.3.1.2.3. Gene <i>CDKN1A</i>	30
1.3.1.2.4. Gene <i>GADD45A</i>	32
1.3.2. Oncogenes.....	34
1.3.2.1. Gene <i>SET</i>	34
1.3.2.2. Gene <i>FGF2</i>	35
1.4. Organismos modelo como indicadores biológicos de poluição ambiental	36
1.5. Objetivos da Tese	37
Capítulo 2 – Material e Métodos	39
2.1. Exposição e Amostragem	41
2.2. Análise da concentração de radionuclídeos em amostras de água	41
2.3. Preservação dos tecidos e extração de RNA total	42
2.4. Síntese de cDNA	44
2.5. Quantificação da expressão genética - PCR em Tempo Real.....	45
2.5.1. Desenho dos primers	45
2.5.3. Determinação da expressão genética	48
2.5.3.1. Normalização dos resultados	49

2.5.3.1.1. Genes de Referência.....	49
2.5.3.1.1.1. Gene <i>HMBS</i> (Hidroximetilbileno Sintase).....	50
2.5.3.1.1.2. Gene <i>HPRT1</i> (Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase)	50
2.5.3.1.1.3. Actinas.....	51
2.5.3.1.1.3.1. Gene <i>ACTB</i> (β -actina).....	51
2.5.3.1.1.4. Gene <i>YWHAZ</i> (“yrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta”)	51
2.5.3.1.1.5. Gene <i>PGK1</i> (Fosfoglicerase cinase 1)	52
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	53
3.1. Análise da concentração de radionuclídeos em amostras de água.....	55
3.2. Análise da expressão genética das amostras de Pulmão, Rim e Fígado	60
Capítulo 4 – Conclusão	71
Capítulo 5 – Perspetivas Futuras.....	75
Bibliografia.....	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Bolo amarelo num contentor para armazenamento ou transporte (WNA, 2017).	4
Figura 2 - (A) Dióxido de Urânio em pó e na forma de pastilha. (B) Barras de combustível (WNA, 2017).	6
Figura 3 - Diagrama de um reator de água pressurizada (WNA, 2017).	6
Figura 4 - Localização geográfica da mina da Cunha Baixa. Adaptado de EDM, 2013; Pereira et al., 2013.	7
Figura 5 - Aspeto de uma estação de tratamento de águas ácidas da mina da Cunha Baixa (Pereira et al., 2013).	8
Figura 6 - Mecanismos de indução de stresse oxidativo provocado por metais. Adaptado de Ercal et al., 2001.	11
Figura 7 – (A) Cadeia de decaimento do ^{238}U . (B) Cadeia de decaimento do ^{235}U . α : radiação alfa; β : radiação beta; a: anos; m: meses; d: dias; h: horas; s: segundos. Adaptado de ATSDR, 2013.	14
Figura 8 – (A) Capacidade de penetração das partículas α , β e neutras, e raios γ e X. (B) Emissão de partículas α , β , e neutras e raios γ a partir de um núcleo de um átomo. Adaptado a partir de www.mirion.com	15
Figura 9 – Representação esquemática dos efeitos da radiação ionizante. Adaptado de IAEA, 2004.	16
Figura 10 - Tipos de danos que podem ocorrer na molécula de DNA (Helleday et al., 2014).	21
Figura 11 - Ilustração mostrando a ativação da proteína ATM (Guleria & Chandna, 2016).	25
Figura 12 - Via de ativação de ATM por DSBs no DNA. As setas indicam vias de ativação. Adaptado de Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006.	26
Figura 13 - Via de ativação da TP53. As setas indicam vias de ativação. Adaptado de Vogelstein et al., 2000.	28
Figura 14 – Via de ativação/inibição da pRB. As setas correspondem a mecanismos de ativação. A vermelho encontram-se a via de ativação da pRB e a preto a via de inibição da pRB. Adaptado de Henley and Dick, 2012.	30
Figura 15 – Via de sinalização de CDKN1A. Adaptado de Besso et al. 2008 e Cazzalini et al. 2010. As setas indicam vias de ativação.	31

Figura 16 - Proteínas envolvidas na regulação do gene GADD45A e os seus alvos genéticos. As setas indicam uma regulação positiva. Adaptado de Salvador et al., 2013. .33	33
Figura 17 - Via de regulação de SET-PP2A em CML. Adaptado de Oaks and Ogretmen, 2015. A preto encontram-se a via de ativação de SET e a vermelho a via de inibição.34	34
Figura 18 - <i>Oryctolagus cuniculus</i> . Fonte: veterinaria-atual.pt.....37	37
Figura 19 – Desenho experimental do presente estudo.41	41
Figura 20 - Esquema do protocolo de estabilização e extração do RNA. Adaptado do RNeasy® Mini Handbook de 2012.43	43
Figura 21 – Desenho experimental da análise por qPCR em Tempo-Real, adaptado de Nolan et. al, 2006.....48	48
Figura 22 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de pulmão após um mês de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística não mostrou significância nos genes analisados ($p > 0,05$).61	61
Figura 23 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de pulmão após três meses de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em três genes analisados ($p < 0,05$).63	63
Figura 24 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de fígado após um mês de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em dois genes analisados ($p < 0,05$).65	65
Figura 25 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de rim após um mês de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em dois genes analisados ($p < 0,05$).68	68
Figura 26 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de rim após três meses de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em três genes analisados ($p < 0,05$).69	69

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Sequências dos primers usados na análise de qPCR. Os primers foram desenhados usando o OligoPerfect™ (ThermoFisher Scientific), o “folding” foi analisado usando o “m-fold” para DNA e a complementaridade foi determinada usando o OligoCalc. Todos os primers amplificam fragmentos com cerca de 100 a 300 pares de bases e têm uma temperatura de “melting” de aproximadamente 60°C.	47
Tabela 2 – Primers usados para aceder ao cálculo da eficiência da reação dos genes <i>RB</i> , <i>ATM</i> e <i>FGF2</i> , nos três órgãos analisados.	47
Tabela 3 – Concentração de radionuclídeos em solução presentes na água do poço usado para fornecer água aos organismos, com base em amostras recolhidas no dia 2 de outubro de 2013.....	59

Lista de Abreviaturas:

ACTB	Beta Actina
AML	Leucemia Mieloide Aguda, do inglês "Acute Myeloid Leukemia"
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATR	ATM-Rad3
B-CDK1	Complexo Ciclina B-CDK1, do inglês "Cyclin B-CDK1 complex"
CDK	Cinase Dependente de Ciclina
CDKN1A	Inibidor 1 A de Cinase Dependente de Ciclina
cDNA	DNA complementar
CML	Leucemia Mieloide Crônica, do inglês "chronic myelogenous leukemia"
COS	Do inglês "Fibroblast-like cell line"
CV	Coeficiente de Variação
DDR	Resposta ao Dano no DNA, do inglês "DNA Damage Response"
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPC	Ligação cruzada entre DNA-Proteína, do inglês "DNA-protein crosslink"
DSB	Quebra da Cadeia Dupla do DNA, do inglês "DNA double strand break"
etBR	Brometo de Etídio
FGF2	Fator de Crescimento Fibroblástico 2
FGFR	Recetor de Fator de Crescimento Fibroblástico
GADD45A	Indutor Alfa 45 da Paragem do Crescimento e Dano no DNA
HCT116	Do inglês "Human Colon Carcinoma Cell Line"
HMBS	Hidroximetilbileno Sintase
HPRT1	Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase 1
HR	Recombinação Homóloga, do inglês "homologous recombination"
LCs	Células "Langerhans", do inglês "Langerhans cells"
LET	Transferência Linear de Energia, do inglês "Linear Energy Transfer"

Locais AP	Locais Apurínicos/Apirimidínicos, do inglês “Apurinic/Apyrimidinic sites”
ML-1	Linhagem celular de células Mieloides Cancerígenas
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (“National Center for Biotechnology Information”)
NHEJ	“Non-Homologous End Joining”
NK	“Natural Killer”
NTC	“Non Template Control”
NRT	“Non Reverse Transcriptase Control”
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGK1	Fosfoglicerasse Cinase 1
pRB	Proteína Retinoblastoma
qPCR	PCR (“Polymerase Chain Reaction”) Quantitativo em Tempo Real
RBE	Eficácia Biológica Relativa, do inglês “Relative Biological Effectiveness”
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SET	Proto-oncogene SET
SSB	Quebra da Cadeia Simples do DNA, do inglês “DNA Single-Strand Break”
TP53	Proteína Tumoral 53
UV	Radiação Ultra Violeta
YWHAZ	“Yrosin 3-Monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeeta”
ΔΔCq	Análise de quantificação relativa

Lista de trabalhos apresentados/submetidos como parte desta dissertação

Apresentação oral:

Vaz A., Pereira R., Marques S., Carvalho F., Malta M., Oliveira J., Mendo S., Lourenço J. (2017)
Uranium mining legacy sites: genetic effects of metals and low-dose radiation in farm animals exposed to contaminated water and foodstuffs. 18th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC), which will be held in Porto (Portugal) from 26 to 29 November 2017.

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Urânio

O urânio é um metal, descoberto por Martin Heinrich Klaproth em 1789, com grande potencial para causar uma série de efeitos adversos na saúde humana (Craft et al., 2004; Dewar et al., 2013; Grenthe et al., 2008). Este metal, cuja concentração na crosta terrestre é de cerca de 2 a 4 mg/kg, na sua forma natural é composto por três isótopos radioativos, ^{238}U , ^{235}U e ^{234}U , que são quimicamente iguais, mas com propriedades radiológicas diferentes (ATSDR, 2013; Craft et al., 2004; Lourenço et al., 2016). Este pode ser encontrado no solo, água e rochas, resultando da redução termal de anidrido de urânio tetracloreto (UCl_4) (Craft et al., 2004). Existem três tipos de misturas de urânio (baseadas na percentagem de composição dos três isótopos): natural, enriquecido e o empobrecido (do inglês, “depleted uranium”) (Lourenço et al., 2016). No urânio natural, o isótopo mais comum é o ^{238}U (99,274%), seguido do ^{235}U (0,72%) e por fim o ^{234}U (0,005%). No urânio enriquecido, a percentagem de ^{235}U e de ^{234}U é aumentada através de um processo de enriquecimento (Lourenço et al., 2016). Por fim, o urânio empobrecido, que é um subproduto do processo de enriquecimento, contém baixos níveis de ^{235}U e ^{234}U , quando comparado com o urânio natural e, conseqüentemente, é menos radioativo (ATSDR, 2013; Lourenço et al., 2016).

Durante o primeiro século após ter sido descoberto, o urânio era utilizado como corante para cerâmica e vidro (Grenthe et al., 2008). O conhecimento acerca deste elemento era diminuto até que Henri Becquerel, em 1896, descobriu que o urânio emitia raios penetrantes. Mais tarde, em 1902, Marie Curie, que trabalhava com o seu marido Pierre, desenvolveu uma técnica quantitativa de medição da radioatividade do urânio e descobriu, por separação química, que existiam outros elementos presentes em certos níveis da cadeia de decaimento do minério, tais como o tório, o polônio e o rádio (Grenthe et al., 2008). Atualmente o urânio natural é enriquecido para ser utilizado para a fabricação de combustível nuclear para as centrais nucleares (sendo utilizado para a produção de energia elétrica) (ATSDR, 2013; Grenthe et al., 2008) e para a construção de armas nucleares (ATSDR, 2013; Lourenço et al., 2016). No caso do armamento nuclear, é necessário que o urânio contenha até 97,3% de ^{235}U (Lourenço et al., 2016). Este radioisótopo torna-se, assim, importante quer para geração de energia nuclear quer para armamento nuclear, uma vez que é o único isótopo natural que é físsil, ou seja, que pode ser separado por neutrões lentos (térmicos) produzindo uma reação em cadeia que liberta grandes quantidades de energia (Lourenço et al., 2016). Quanto ao urânio empobrecido, ele é usado como um escudo protetor contra a radiação ionizante; no fabrico de munições com capacidade para penetrarem veículos blindados; e também

como blindagem em algumas partes de veículos militares (ATSDR, 2013). Todas estas aplicações foram possíveis, direta ou indiretamente, devido à descoberta da fissão nuclear em 1938 por Hahn e Strassman (Grenthe et al., 2008).

Desde 1970, o mundo tem assistido a um rápido crescimento na procura de energia, maioritariamente proveniente de combustíveis fósseis (WEC, 2016). A energia nuclear emerge, assim, como uma fonte alternativa de energia face às existentes, uma vez que, as emissões de CO₂, resultantes da produção de energia nuclear, são mais reduzidas que as emissões resultantes da produção de energia de, por exemplo, centrais alimentadas a carvão que são uma das grandes responsáveis pelo aumento das emissões de gases de efeito de estufa. Para além disso, os custos de produção de energia também são menores comparando com os preços dos combustíveis fósseis que são elevados (Lourenço et al., 2016).

1.1.1. Extração e Processamento de Urânio – geração de energia elétrica e produção de combustível

Antes de o urânio ser utilizado para gerar combustível nuclear, ele precisa de ser extraído da rocha e posteriormente enriquecido em ²³⁵U. Após este processo, é transformado em “pellets” que são carregados em conjuntos de barras de combustível para os reatores nucleares (WNA, 2017). Posto isto, para gerar energia elétrica é necessário que o urânio contenha 3% a 5% de ²³⁵U (Lourenço et al., 2016; WNA, 2017). Segundo dados da “World Nuclear Association” (WNA), existem atualmente, no mundo, 448 reatores de energia nuclear operáveis e 57 em construção (WNA, 2017).

Existem minas de urânio operacionais em cerca de vinte países, no entanto, cerca de metade da produção mundial provém de apenas dez minas em seis países: Canadá, Austrália, Nigéria, Cazaquistão, Rússia e Namíbia (WNA, 2017). De acordo com dados de 2015 da WNA: o Cazaquistão é o país onde há maior extração de urânio (23800 toneladas), seguindo-se do Canadá (13325 toneladas). A França é o país com menos produção de urânio. Isto é particularmente interessante uma vez que é o 2º



Figura 1 - Bolo amarelo num contentor para armazenamento ou transporte (WNA, 2017).

país com maior consumo de urânio e o segundo maior produtor de energia nuclear (WNA, 2017).

A extração do urânio pode ser realizada por 3 processos diferentes: poços subterrâneos; cratera a céu aberto e lixiviação *in situ* (IAEA, 2002). Mais de metade das minas mundiais usam, atualmente, o método de extração por lixiviação *in situ*, pois permite que a extração seja realizada sem grandes distúrbios, uma vez que os minerais são recuperados do minério sem este deixar a sua localização subterrânea original, e conseqüentemente não são gerados grandes volumes de resíduos à superfície (IAEA, 2002; WNA, 2017). A recuperação dos minerais é feita a partir do uso da água proveniente de aquíferos subterrâneos, fortificados com um lixiviante e, na maioria dos casos, com um oxidante, no corpo do minério, dissolvendo o urânio (WNA, 2017). Para remover o urânio do minério podem ser usados dois tipos de lixiviantes, os ácidos (ácido sulfúrico ou ácido nítrico, sendo este último o menos comumente usado) e os carbonatos (como por exemplo, o bicarbonato de sódio), sendo que, por vezes é adicionado oxigênio para mobilizar o urânio (Grenthe et al., 2008). Assim, para extraír o urânio, a água com o lixiviante circula dentro do minério e a solução obtida é, posteriormente, bombeada para a superfície (WNA, 2017) Este método produz uma solução com o urânio dissolvido, que depois será filtrada, permitindo que o urânio seja separado por troca iônica, precipitado, a partir da solução, e novamente filtrado e drenado para produzir um concentrado de óxido de urânio, que será selado em contentores. Este concentrado pode ter uma coloração amarelada, sendo então conhecido como bolo amarelo (ou “yellowcake”) (Figura 1) (WNA, 2017). No caso dos métodos de cratera a céu aberto ou em poços subterrâneos, após a extração do minério, normalmente recorre-se a uma lixiviação em pilha (quando este já tem uma quantidade de urânio menor, abaixo dos 0,1%), para tentar extrair ao máximo o urânio existente. Durante este processo, o minério é empilhado sob uma superfície impermeável e é irrigado com ácido sulfúrico, fazendo-se a recolha do licor com o urânio dissolvido que vai ser recuperado da mesma forma que no método da lixiviação *in situ* (WNA, 2017).

O uso de ácido sulfúrico, quer no método de lixiviação *in situ* quer na lixiviação que se faz após a extração do minério pelos processos de extração em poços subterrâneos ou em cratera céu aberto, tem um grande potencial para gerar águas ácidas que podem transferir uma quantidade significativa de metais e radionuclídeos dissolvidos para o ambiente, provocando grandes impactos biofísicos e bioquímicos (Lourenço et al., 2016; Pereira et al., 2004). Para tentar prevenir esta transferência, é feita uma drenagem destas águas para uma estação de tratamento, onde se faz a neutralização do pH através da

adição de óxido de cálcio de forma a precipitar o urânio e os radionuclídeos presentes na solução. A remoção dos metais e do rádio é feita por adição de cloreto de bário (Carvalho and Oliveira, 2007; Pereira et al., 2004). Antes das águas tratadas serem descartadas para o ambiente, estas permanecem algum tempo em bacias de decantação para a precipitação dos compostos químicos que gradualmente se vão acumulando no fundo (Pereira et al., 2004), formando as lamas radioativas (Carvalho and Oliveira, 2007).

Para que se possa fazer combustível nuclear, o urânio natural passa por um processo de enriquecimento (WNA, 2017). Na central de enriquecimento faz-se a concentração do ^{235}U por sucessivas centrifugações, sendo posteriormente transportado para uma fábrica de produção de combustível, onde é convertido em dióxido de urânio em pó. Este pó é então compactado para formar pequenas pastilhas que são inseridas em tubos finos para formar barras de combustível (Figura 2) (WNA, 2017). A fração que fica após o processo de enriquecimento é denominado de urânio empobrecido, por apresentar uma percentagem de ^{235}U menor que a do urânio natural (ATSDR, 2013).

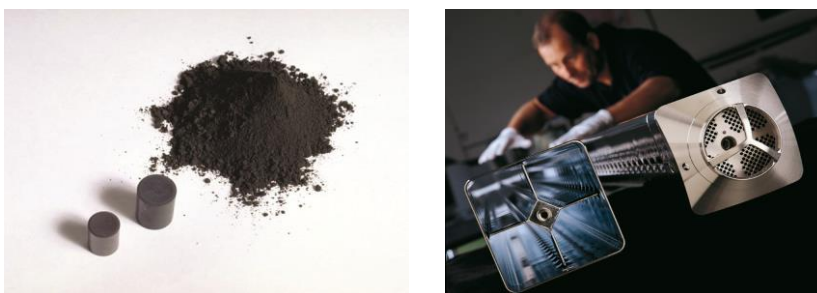


Figura 2 - (A) Dióxido de Urânio em pó e na forma de pastilha. (B) Barras de combustível (WNA, 2017).

Para gerar energia nuclear, um reator tem de produzir e controlar a libertação de energia proveniente da divisão dos átomos de urânio. No núcleo do reator, o isótopo ^{235}U divide-se sucessivamente numa reação em cadeia, um processo contínuo que produz uma grande quantidade de energia sob a forma de calor, e que depende de um moderador, como água, que desacelera os neutrões produzidos pela fissão dos núcleos de urânio para que eles continuem a chocar com mais isótopos ^{235}U e produzir mais reações de fissão (WNA, 2017). Todo o calor produzido faz com que se forme vapor de água, que faz com que as turbinas

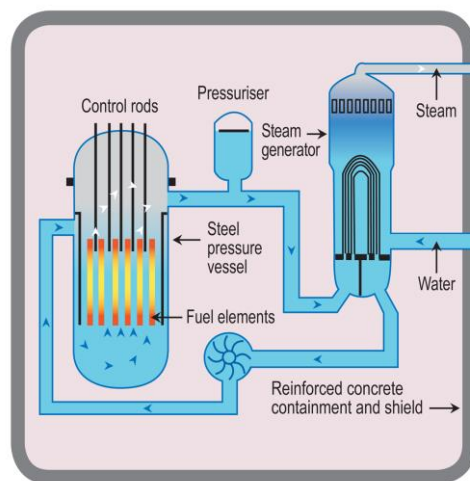


Figura 3 - Diagrama de um reator de água pressurizada (WNA, 2017).

girem e produzam eletricidade (NEI, 2017; WNA, 2017).

Os resíduos gerados durante a produção de energia elétrica são transferidos para um tanque de armazenamento onde permanecem por cerca de cinco anos, sendo posteriormente transferidos para uma piscina onde, normalmente, permanecem por 50 anos. Estes resíduos são categorizados em três níveis (alto, intermédio e baixo nível de atividade), sendo que, os resíduos de alto nível de atividade são depositados em reservatórios geológicos subterrâneos, e os resíduos de nível intermédio ou baixo serão depositados na superfície (WNA, 2017).

1.1.2. Extração de Urânio na mina da Cunha Baixa

Em Portugal, a exploração de metais radioativos começou em 1908 e terminou em 2001, ocorrendo principalmente no centro-norte do país (Carvalho et al., 2009a). Cerca de 60 minas foram exploradas para a produção de rádio e urânio nos distritos de Viseu e Guarda (Carvalho and Oliveira, 2007). A mina do Barracão, localizada numa vila perto da cidade da Guarda, foi o primeiro depósito a ser descoberto em 1907 (Pereira et al., 2013). No início o elemento de interesse era o rádio, enquanto que o urânio era considerado um sub-produto, tendo a exploração de rádio durado cerca de duas décadas (Pereira et al., 2013). A partir de 1945, o urânio tornou-se um elemento de grande interesse e a sua exploração ocorreu intensivamente nas minas de Urgeiriça e Quinta do Bispo, perto da cidade de Viseu (Pereira et al., 2013). Em 1954, o governo português fundou uma organização responsável pela energia nuclear, a Junta de Energia Nuclear (JEN), substituindo a CPR (Companhia Portuguesa de Rádio), mas após 1978 a Empresa Nacional de Urânio (ENU) ficou responsável pela exploração e tratamento químico do minério radioativo até 2001 (Pereira et al., 2013). Com a cessação das atividades mineiras e encerramento da ENU em 2001, as funções desta empresa foram entregues à Empresa de Desenvolvimento Mineiro (EDM) e os trabalhos de remediação das minas foram entregues à EXMIN, uma companhia incorporada na EDM responsável pelo tratamento dos efluentes da mina (Carvalho, 2014).



Figura 4 - Localização geográfica da mina da Cunha Baixa. Adaptado de EDM, 2013; Pereira et al., 2013.

A mina de urânio da Cunha Baixa está localizada na aldeia da Cunha Baixa que fica a sudeste da cidade de Viseu, (coordenadas: 40.571393 N 7.753322 O) (Lourenço et al., 2013a), e conta com uma área de cerca de 16 Km². Este local de estudo foi selecionado, devido à quantidade de óxido de urânio produzidos, entre 1967 e 1991, período em que houve exploração da mina (Figura 4) (Neves et al., 2005). Os trabalhos mineiros de reconhecimento tiveram início nesta mina em 1967 (EDM, 2013), seguindo-se os trabalhos subterrâneos entre 1970 e 1987 (Pereira et al., 2013), que atingiram a profundidade de 150 m com três pisos e galerias que atingiram 900 m (EDM, 2013). Quase em simultâneo, em 1971, tiveram início os trabalhos a céu aberto, que se prolongaram até março de 1991 (Carvalho et al., 2009b; EDM, 2013; Pereira et al., 2013).

Na exploração subterrânea, o ácido sulfúrico era usado para a lixiviação *in situ* do urânio (Carvalho et al., 2009b), e como consequência, as águas da mina tornaram-se ácidas (pH<3.5) (Antunes et al., 2008; Carvalho et al., 2009b; Pereira et al., 2013), e a drenagem deste ácido afetou a qualidade das águas superficiais e subterrâneas da região, tornando-as impróprias para o consumo e apresentando um risco para os residentes e para o ambiente, uma vez que apresentavam altos níveis de sulfato, Al, Mn, U (principais contaminantes) e valores de pH baixos (<4.5-5) (Neves et al., 2005).

Durante e após o *terminus* das atividades mineiras, a produção de águas ácidas persistiu. Estas eram bombeadas para estações de tratamento, onde eram tratadas com óxido de cálcio para a neutralização do pH e com cloreto de bário para a precipitação do rádio maioritariamente (Figura 5). Depois do tratamento químico, as águas eram bombeadas para lagoas de decantação, para se fazer a precipitação de metais e radionuclídeos. Quando estas atingiam a capacidade máxima o afluyente era despejado num riacho que desagua no rio Castelo (afluyente do rio Mondego), que passa perto da mina. A lama formada a partir da precipitação de partículas e dos elementos químicos e radiológicos, era removida e colocada na cratera da mina (Carvalho et al., 2009a; Pereira et al., 2013, 2008). A lama formada continha altos níveis de metais e radionuclídeos pertencentes à cadeia de decaimento do urânio, potenciando a libertação de radiação e metais



Figura 5 - Aspeto de uma estação de tratamento de águas ácidas da mina da Cunha Baixa (Pereira et al., 2013).

para a água e ar representando um sério risco para o ambiente e população residente, mesmo após as atividades da mina terem cessado (Carvalho and Oliveira, 2007; Neves et al., 2005; Pereira et al., 2008). Assim sendo, nesta área mineira, a contaminação do solo resultou, principalmente, da deposição de resíduos da exploração mineira; da lama resultante a partir do tratamento de efluentes da lagoa e a partir do escoamento destes para os sistemas aquáticos (Carvalho et al., 2009a). Na área agrícola da Cunha Baixa, a água proveniente de poços de irrigação continha elevados níveis de sulfato e baixo pH, apontando a mina da Cunha Baixa como a fonte de contaminação dos lençóis freáticos (Carvalho et al., 2009a). Consequentemente, a colheita de milho nestes solos mostrou teores de urânio nas raízes e folhas que podem representar um risco quer para os animais quer para os solos, quando são usadas, respetivamente, para alimentação animal e fertilização do solo (Neves et al., 2005, 2008).

A atividade mineira da mina da Cunha Baixa cessou em 1993, no entanto só passado alguns anos foram realizadas avaliações preliminares do seu impacto no ambiente, fazendo-se uma caracterização dos locais de extração para identificar e avaliar os aspetos em causa (Neves et al., 2005). A obra de remediação ambiental da antiga área mineira da Cunha Baixa, realizada pela EDM, consistiu nas seguintes atividades principais:

- Obstrução da comunicação hídrica entre o céu aberto I e a parte subterrânea da mina, diminuindo o caudal da água contaminada;
- Supressão de todo o potencial de reatividade, diminuindo, assim, os níveis de radiometria e controlando a dispersão geoquímica e hidroquímica associada aos depósitos mineiros existentes;
- Redução da emissão e conseqüente disseminação de gás radão para a atmosfera;
- Melhoria das estruturas e dos processos ligados ao controlo e tratamento dos efluentes ácidos gerados;
- Garantia da estabilidade das vertentes da escombreira mais volumosa (E1);
- Supervisão do escoamento superficial por todo o perímetro da área mineira, por forma a diminuir fenómenos de erosão e aflúências descontroladas de águas pluviais nos céus abertos existentes (I, II, III e IV);
- Melhoramento das condições gerais de segurança pública e dos organismos que habitem nos arredores da mina de urânio;

- Inclusão, de uma forma paisagística e ecológica, de toda a área diretamente afetada pela atividade mineira, bem como das áreas localizadas nas imediações da mina de urânio;
- Consciencialização para o uso de águas de boa qualidade para irrigação das áreas agrícolas, a jusante da mina de urânio (EDM, 2013).

1.1.3. Contaminantes provenientes de resíduos da extração de urânio

Durante cerca de um século de exploração de urânio, cerca de 13 milhões de toneladas de resíduos radioativos foram deixados nos locais de exploração (Pereira et al., 2013) e, portanto, as minas abandonadas exibem altos níveis de contaminação que se apresentam como um risco radiológico e químico quer para o ambiente como para a população residente nos arredores da mina (Carvalho et al., 2009a; Neves et al., 2012b).

1.1.3.1. Metais

Os metais ocorrem naturalmente na crosta terrestre e são contaminantes ambientais persistentes, uma vez que não podem ser degradados ou destruídos (Duruibe et al., 2007). O urânio é um metal que se encontra naturalmente no meio ambiente (Read, 2005). No entanto também existem fontes antropogénicas de urânio que estão associados ao ciclo do combustível nuclear, onde se inclui a extração, moagem e a deposição imprópria dos seus resíduos, processamento (conversão de urânio e enriquecimento), fabrico de combustível nuclear, produção de armas nucleares, testes nucleares e desastres nucleares. Para além disso, a produção de fertilizantes fosfatados, a partir de rochas fosfatadas contendo urânio, é também considerada uma fonte antropogénica de urânio (ATSDR, 2013; Lourenço et al., 2016; Read, 2005).

Os metais podem ser definidos como “elementos que conduzem eletricidade, têm um brilho metálico, são maleáveis e dúcteis, formam catiões e possuem óxidos básicos” (Duffus, 2002). No entanto existe uma necessidade de categorizar os metais, sendo que esta categorização deve ser feita tendo em conta as propriedades químicas do metal. Assim sendo, podemos dividir os metais em três classes com base no comportamento dos ácidos de Lewis: a classe A (ácidos de Lewis de pequeno tamanho e polarizabilidade), onde se incluem o Li, Be, Na, Mg, Al, K, Ca, Sc, Ti, Fe(III), Rb, Sr, Y, Zr, Cs, Ba, La, Hf, Fr, Ra, Ac e Th; a classe B (ácidos de Lewis de tamanho e polarizabilidade grande), onde se incluem o Cu(I), Pd, Ag, Cd, Ir, Pt, Au, Hg, Ti e Pb(II); os metais intermediários, onde se inclui V, Cr, Mn, Fe(II), Co, Ni, Cu(II), Zn, Rh, Pb(IV) e

Sn (Duffus, 2002). Durante as últimas cinco décadas, a indústria de extração de urânio, em Portugal, gerou volumes consideráveis de resíduos que continham altos níveis de metais tóxicos, sendo a mina da Cunha Baixa um exemplo disto (Antunes et al., 2008). Vários elementos químicos foram encontrados em amostras de diferentes compartimentos ambientais da mina da Cunha Baixa, em que grande parte eram sulfatos, flúor, Ca, Fe, Mn, Al, S, Zn, Ni, Co, Be e U (Pereira et al., 2004). Quando a pirite (FeS_2) e outros minerais com sulfuretos, presentes nos locais de exploração, são expostos ao ar e à água na presença da bactéria *Thiobacillus ferrooxidans*, é gerado uma drenagem ácida, como o caso do ácido sulfúrico (Duruibe et al., 2007). Este ácido tem a capacidade de dissolver os metais, presentes no solo, aumentando a sua solubilidade, biodisponibilidade e mobilidade no ambiente (Goyer and Group, 2003).

Alguns destes contaminantes têm a capacidade de induzir genotoxicidade e carcinogénese, uma vez que podem afetar várias vias celulares, tais como reparação do DNA, regulação de fatores de transcrição, regulação da expressão genética, apoptose, regulação do crescimento celular, indução da expressão de oncogenes e também podem afetar as vias de transdução de sinal (Goyer and Group, 2003). Para além disto, os metais também têm a capacidade de interferir com sistemas de defesa antioxidante, ligando-se aos grupos sulfidrilos de proteínas envolvidas nesta defesa, e /ou com reações

de catalisação do tipo Fenton, onde endogenamente levam à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Ercal et al., 2001; Leonard et al., 2004). As ROS interagem com lípidos (provocando danos na membrana celular), proteínas (levando à sua disfunção) e com o DNA, levando à oxidação dos ácidos nucleicos que juntamente com uma atuação ineficiente dos sistemas de reparação do DNA pode conduzir à morte da célula, à mutagénese ou carcinogénese (Figura 6) (Ercal et al., 2001). As ROS incluem: radicais superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), óxido nítrico (NO^-), radicais peróxilos (ROO^-), radicais alcóxilos (RO^-)

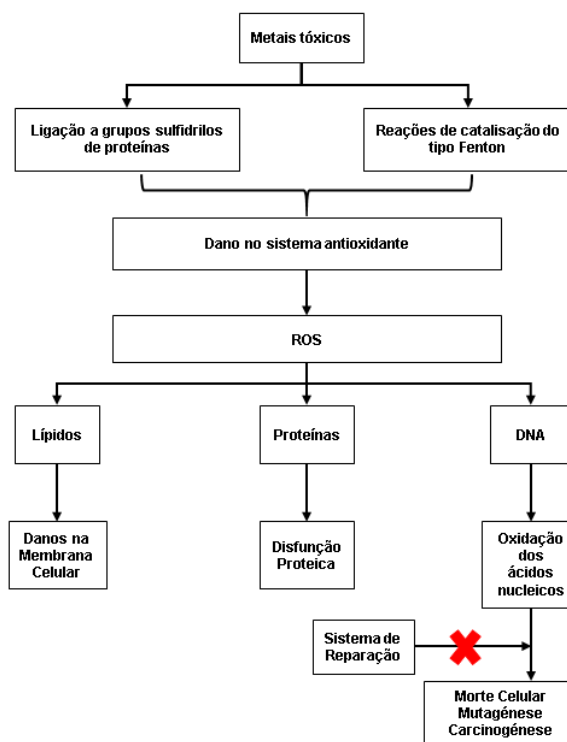


Figura 6 - Mecanismos de indução de stress oxidativo provocado por metais. Adaptado de Ercal et al., 2001.

e radicais tiolos (RS^-) (Leonard et al., 2004). O papel das ROS aparenta ser um passo importante em respostas celulares induzidas por metais, uma vez que podem provocar acumulação de danos no DNA (Ercal et al., 2001; Li, 2008). Para metais como o ferro (Fe), o cobre (Cu), o crómio (Cr), o vanádio (V), o cobalto (Co) e o urânio (U), a principal via de toxicidade são as reações de oxidação-redução, por exemplo reações Fenton e reações do ciclo de Haber-Weiss, no entanto, para metais como o mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e níquel (Ni), a principal via de toxicidade é saturação das glutations (GSH) e a ligação a grupos sulfidrilos de proteínas (Ercal et al., 2001).

Para além de serem um risco para a população e organismos que residam nos arredores da mina da Cunha Baixa, os metais e metaloides presentes nos resíduos de extração e processamento do urânio, como o caso do níquel, cádmio, arsénio e selénio, também apresentam um risco para o próprio ambiente (Lourenço et al., 2016). A exposição dos resíduos de exploração aos processos geodinâmicos tem promovido a transferência destes elementos para diferentes compartimentos ambientais, onde estes têm a probabilidade de se tornar biodisponíveis ganhando um potencial impacto nas comunidades edáficas (conjunto de animais que vive dependente diretamente do solo) (Lourenço et al., 2016). O uso de água contaminada com metais e radionuclídeos, para irrigação, pode modificar as propriedades do solo, aumentando a concentração destes contaminantes. Isto leva a que, a vegetação que cresce nestes solos assimile estes contaminantes facilitando a deposição destas substâncias na parte aérea das plantas, como caules, folhas, flores ou frutos, durante o seu ciclo de crescimento normal, potenciando a sua transferência através da cadeia alimentar (Dewar et al., 2013; Neves et al., 2005).

1.1.3.2. Radionuclídeos

Os locais históricos de mineração e moagem de urânio em Portugal, muitas vezes localizados perto de aldeias e em áreas de agricultura, levantaram preocupações com a radioatividade no ar, na água, e em produtos agrícolas devido à potencial exposição à radiação das populações através da transferência de radionuclídeos pela cadeia alimentar (Carvalho et al., 2009b; Falcão et al., 2006; Neves et al., 2012b). Desta forma, não são só os trabalhadores mineiros estão sujeitos à exposição ao urânio, mas também a população que habita nos arredores das minas, através da ingestão de alimentos e água contaminados, e também através da inalação de poeiras resultantes dos trabalhos mineiros e deposição inapropriada dos seus resíduos (ATSDR, 2013).

O urânio (U) é um metal radioativo que sofre transformação espontânea (decaimento) durante a qual é libertada energia, quer seja sob a forma de partículas, como o caso da radiação α , quer seja por radiação eletromagnética com energia suficiente para causar ionização, como o caso dos raios gama (embora com um poder ionizante bastante inferior quando comparado com a radiação α) (ATSDR, 2013; Darolles et al., 2010). O processo de decaimento do urânio leva à formação de novos elementos, que decaem também, até se produzir um elemento estável (ATSDR, 2013). O urânio e a maioria dos produtos de decaimento decaem por emissão de radiação α , alguns por emissão de radiação β , transformando-se em isótopos radioativos de outros elementos (ATSDR, 2013; Skwarzec et al., 2012). A cadeia de decaimento do isótopo de urânio mais comum (o ^{238}U) é composto por radionuclídeos de longa-vida como o ^{226}Ra , ^{222}Rn , ^{210}Po e o ^{210}Pb que contribuem para cerca de 99,75% da dose de radiação total recebida pelo público e por quaisquer organismos expostos a estes contaminantes (Lourenço et al., 2016). O ^{210}Po (polónio) é um elemento natural bastante radioativo que resulta do decaimento de ^{222}Rn (radão) que é um elemento que por sua vez resulta do decaimento radioativo do ^{226}Ra (rádio) (Skwarzec et al., 2012). O ^{226}Ra por sua vez é produzido pelo decaimento do ^{230}Th (tório) (IAEA, 2009; Lourenço et al., 2016). Devido ao facto de o ^{230}Th possuir um tempo de meia-vida de 80 000 anos e do tempo de meia-vida do ^{226}Ra ser de 1600 anos, o gás radão é continuamente produzido tornando-se um risco para o ambiente e para os organismos (Lourenço et al., 2016). Quando inalado este gás emite partículas α que são altamente ionizantes, depositando toda a sua energia nas células e tecidos do corpo, aumentando assim o risco de cancro nos pulmões (Vahakangas et al., 1992).

O radioisótopo ^{238}U decai através de 16 elementos radioativos, incluindo o ^{234}U , até se transformar em ^{206}Pb (estável). Enquanto que o radioisótopo ^{235}U decai através de 13 elementos radiativos para se transformar em ^{207}Pb (estável) (Figura 7) (ATSDR, 2013). A taxa de decaimento (ou tempo de meia-vida - quantidade de tempo necessário para desintegrar metade dos átomos de um radionuclídeo, transformando-o num elemento diferente com libertação de radioatividade), para a maioria dos isótopos de urânio é longa, por exemplo o isótopo ^{238}U tem um tempo de meia-vida de 4,5 biliões de anos, o que significa que cada átomo de urânio decai muito infrequentemente, resultando numa baixa atividade específica (ATSDR, 2013; Craft et al., 2004; Dewar et al., 2013; Lourenço et al., 2016).

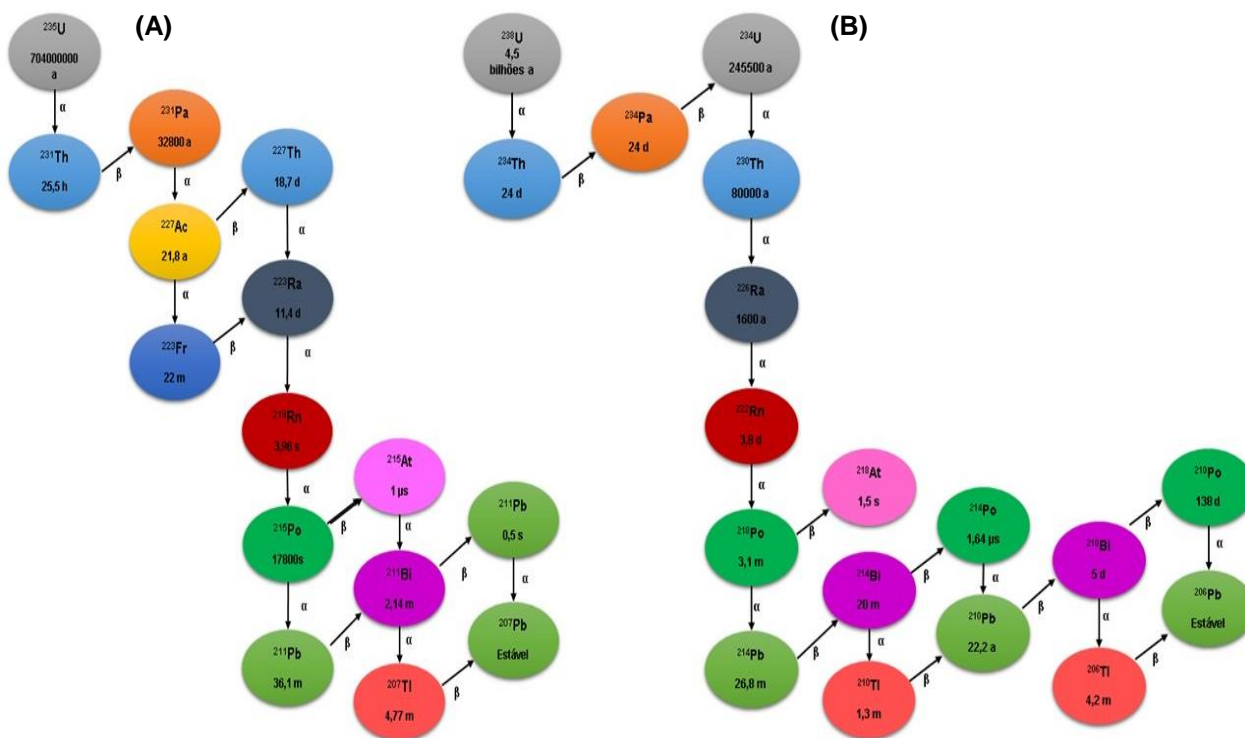


Figura 7 – (A) Cadeia de decaimento do ^{238}U . (B) Cadeia de decaimento do ^{235}U . α : radiação alfa; β : radiação beta; a: anos; m: meses; d: dias; h: horas; s: segundos. Adaptado de ATSDR, 2013.

Em amostras de solo e água coletadas nos arredores da mina da Cunha Baixa observou-se a presença de alguns radionuclídeos da cadeia de decaimento do urânio, tais como ^{226}Ra , ^{234}U , ^{230}Th , ^{210}Po e ^{210}Pb , sendo a maioria emissores de partículas alfa (Lourenço et al., 2012; Pereira et al., 2004).

A radiação é definida como a energia que viaja através do espaço. Por exemplo, a luz e o calor emitidos a partir de reações nucleares no Sol é uma forma familiar de radiação e essencial para a nossa existência (IAEA, 2004; WNA, 2017). Os materiais radioativos encontram-se naturalmente no ambiente e nos organismos (IAEA, 2004). A radioatividade é um fenômeno que pode ser natural ou artificial, e é definida como a emissão espontânea de partículas (alfa, beta e neutrões) ou fótons (radiação gama e X), ou ambos ao mesmo tempo, a partir do decaimento de um determinado radionuclídeo devido a um ajustamento da sua estrutura interna (NE, 2016).

Um radionuclídeo é um átomo com um núcleo instável, que ocorre naturalmente, mas que também pode ser produzido artificialmente e que emite radiação ionizante (NE, 2016; WNA, 2017). Existem três tipos de partículas que são emitidas por radionuclídeos: partículas α , β e os neutrões. Estes tipos de partículas radioativas são perigosas, mas diferem, uma das outras, no seu poder de penetração (Figura 8) (Winfield et al., 2006).

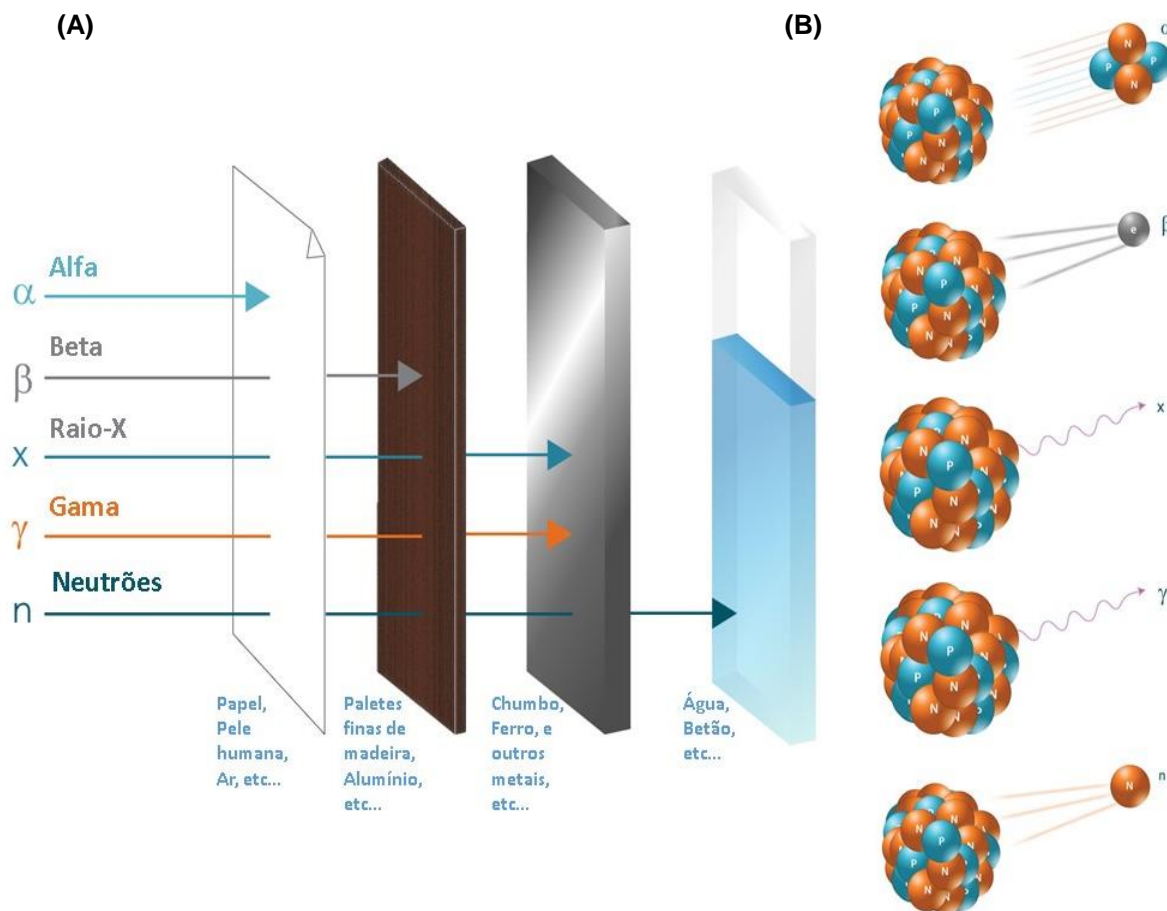


Figura 8 – (A) Capacidade de penetração das partículas α , β e neutras, e raios γ e X. (B) Emissão de partículas α , β , e neutras e raios γ a partir de um núcleo de um átomo. Adaptado a partir de www.mirion.com.

Uma partícula α (compostas por 2 prótons e 2 nêutrons), é estruturalmente idêntica a um núcleo de hélio de carga positiva, que pelo seu tamanho não consegue penetrar a pele humana, uma folha de papel, ou até mesmo alguns milímetros de ar. No entanto, se for inalada ou ingerida pode ser extremamente tóxica, uma vez que é altamente ionizante libertando a sua energia nas células com que esteja em contacto, originando graves danos no organismo (Dewar et al., 2013; IAEA, 2004; Winfield et al., 2006). As partículas β são elétrons emitidos a partir de um átomo com um núcleo instável, que conseguem penetrar papel e atravessar alguns centímetros de tecido humano (como a pele), contudo não conseguem atravessar metal, plástico ou vidro (IAEA, 2004; Winfield et al., 2006). Normalmente, este tipo de partículas não consegue penetrar mais do que a camada superficial da pele, no entanto, grandes exposições podem causar queimaduras (IAEA, 2004). Os neutrões emitidos por um núcleo instável durante a fissão atômica e fusão nuclear, têm elevada capacidade de penetração, sendo bloqueados por escudos de betão ou água (Winfield et al., 2006). Por fim, os raios gama são fótons de radiação

eletromagnética com uma energia elevada, emitidos por um núcleo instável que é, frequentemente ao mesmo tempo, um emissor de partículas β (IAEA, 2004). O que distingue esta radiação face às partículas acima mencionadas é que, por se tratarem de fótons, podem ser bastante penetrantes e apenas materiais densos como aço ou chumbo podem impedir a sua passagem (IAEA, 2004). Para além disto, este tipo de radiação consegue infligir doses significativas para os órgãos internos sem haver inalação ou ingestão (IAEA, 2004).

1.2. Efeitos da exploração de urânio para a saúde humana

Os diferentes tipos de radiação emitidos por estas partículas estão associados a efeitos negativos, como danos celulares e cancro (UNSCEAR, 2000). A razão para isto incide na energia depositada quando estas partículas passam através da matéria, interagindo com os eletrões da própria matéria (IAEA, 2004). O processo pelo qual uma molécula, ou um átomo neutro, se torna eletricamente carregado, designa-se de ionização e a entidade resultante designa-se de ião. Uma vez removido do átomo, um eletrão pode ionizar outros átomos ou moléculas. Assim sendo, qualquer radiação que cause ionização é conhecida por radiação ionizante (IAEA, 2004).

É de salientar que, a exposição de células à radiação ionizante causa danos celulares severos, quer diretamente por distúrbio da integridade do DNA ou indiretamente por formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) ou radicais hidroxilos (Figura 9) (Beer et al., 2014; Hada and Georgakilas, 2008). No caso da formação de ROS, sendo uma célula composta por 80% de água, à medida que a radiação ionizante passa, as suas moléculas tornam-se eletricamente carregadas levando à formação destes radicais que são quimicamente reativos e que podem alterar e danificar moléculas importantes na célula, como o DNA (Hada and Georgakilas, 2008; IAEA, 2004; Leonard et al., 2004).

Devido a todos os fenómenos acima descritos, a dispersão de radionuclídeos no ambiente tornou-se um problema radiológico após o *terminus* das atividades mineiras (Carvalho and Oliveira, 2007).

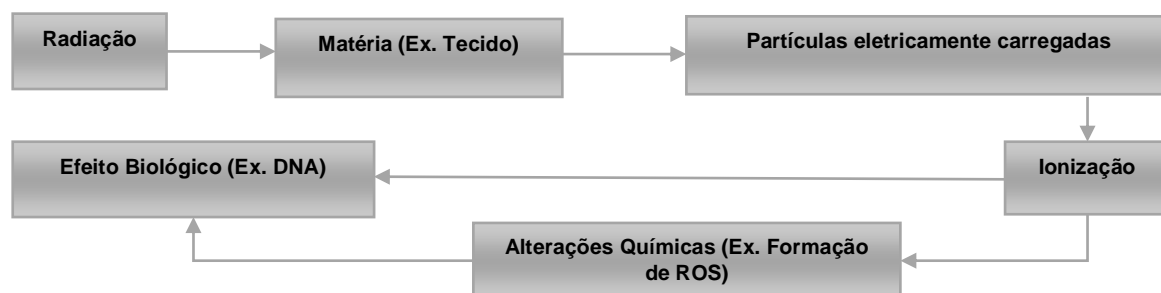


Figura 9 – Representação esquemática dos efeitos da radiação ionizante. Adaptado de IAEA, 2004.

Preocupações ambientais e de saúde, relacionadas com a exploração de urânio, podem ser categorizadas como: saúde e segurança dos trabalhadores e da mina; saúde e segurança da população nas imediações, que podem ser afetadas pela propagação da radioatividade a partir de resíduos; e efeitos globais, na saúde e ambiente, do aumento da radiação e contaminação de águas e solos (Dewar et al., 2013).

A exposição ao urânio e aos radionuclídeos descendentes, bem como a metais, está ligada a uma série de efeitos negativos alguns deles com grande importância em processos fisiológicos, tais como a hematopoiese, função renal e desenvolvimento ósseo, estando também associada a efeitos genotóxicos (Lourenço et al., 2013c). A contaminação do ambiente devido à exploração do urânio, poderá persistir por gerações, sendo que, a incidência de cancro, problemas de fertilidade e doenças hereditárias pode aumentar com a exposição à radiação e aos metais acima referidos (Dewar et al., 2013).

Em trabalhos anteriores de biomonitorização da população humana da aldeia da Cunha Baixa, os autores mostraram que a mina de urânio tinha efeitos negativos na comunidade desta região, tais como: efeitos genotóxicos, bioacumulação de metais (Mn e U), diminuição dos níveis de zinco e depleção de compartimentos celulares importantes do sistema imunitário tais como linfócitos NK e T (provocando uma diminuição na defesa do organismo contra o desenvolvimento de cancro) (Lourenço et al., 2013c). A população pode ter sido exposta a metais e radionuclídeos, quer por inalação de poeiras, quer por ingestão de comida e água contaminada, uma vez que através da informação coletada por questionários, os autores puderam concluir que a maioria dos participantes mencionou a ingestão de produtos locais e água de fontes locais (Lourenço et al., 2013c).

Em suma, no geral, os humanos e restantes organismos podem estar expostos a radionuclídeos através da radiação emitida por resíduos de extração/processamento; poeiras radioativas; contaminação de águas e cadeia alimentar, bem como pela produção de gás radão (Lourenço et al., 2011b; Organo and Fenton, 2008).

O urânio é um metal que é pobremente absorvido após a exposição por inalação, ingestão ou exposição da pele, sendo excretado, maioritariamente, pela urina, mas também pelas fezes. A quantidade de absorção é altamente dependente da solubilidade do composto, uma vez que se trata de um metal que forma compostos e complexos de diferentes variedades e solubilidades (ATSDR, 2013).

Em geral, os compostos mais solúveis, como o caso do urânio tetracloreto, são menos tóxicos para os pulmões mas, como são facilmente absorvidos para a corrente sanguínea e transportados para órgãos distais, tornam-se mais tóxicos nestes órgãos (ATSDR, 2013). O urânio que é absorvido para a corrente sanguínea é excretado pela

urina, tendo sido observados danos nos rins quer em humanos ou em animais (ATSDR, 2013). Tal como o que acontece nos ossos, o cálcio pode ser substituído pelo urânio nos rins levando a que este órgão seja alvo de acumulação deste metal o que pode dar origem a uma série de danos (ATSDR, 2013; Vidaud et al., 2005). A exposição de animais ao urânio tem mostrado que este tem um grande potencial para causar problemas nos rins, nomeadamente degeneração dos túbulos proximais, alterações glomerulares, necrose, hipertrofia de células do tecido epitelial e fibrose (Arzuaga et al., 2010; Craft et al., 2004). No caso de compostos menos solúveis, como o caso do trióxido de urânio, estes podem permanecer no tecido pulmonar por um longo período de tempo, resultando numa contínua exposição à sua toxicidade química e à radiação alfa (ATSDR, 2013). Estudos sobre os efeitos respiratórios de uma exposição aguda ao urânio mostraram que este tinha um grande potencial para causar congestões nasais, hemorragias e fibrose pulmonar, bem como cancro (Craft et al., 2004).

Para deduzir os possíveis efeitos biológicos da radiação, é usado um indicador unidimensional designado de transferência linear de energia ou LET (UNSCEAR, 2000). A LET é descrita como a quantidade de energia que é transferida da partícula para a matéria por unidade de distância (UNSCEAR, 2000). Os estudos radiobiológicos indicam que radiações de alto LET (partículas α e neutrões) têm um efeito biológico mais elevado que a radiação com baixo LET (como o caso dos eletrões e radiação gama) (Harrison and Day, 2008; UNSCEAR, 2000). A influência da qualidade da radiação num sistema biológico é quantificada pela sua eficácia biológica relativa (RBE), que é definida como a razão da eficácia biológica de um tipo de radiação ionizante em relação a outro tipo de radiação, dada a mesma quantidade de energia absorvida (UNSCEAR, 2000). A RBE varia com a dose de radiação, ou seja, para radiações de alto LET a RBE é alta, enquanto que para radiações de baixo LET a RBE é baixa (Goodhead et al., 2002).

Para além da radiação, os metais presentes nos resíduos da extração de urânio também são uma preocupação de saúde pública e ambiental (Leonard et al., 2004). Metais como o ferro, o cobre, o manganês e o zinco são essenciais para os humanos o que faz com que uma dieta deficiente nestes metais seja prejudicial à saúde. No entanto, elementos essenciais também podem causar efeitos tóxicos a elevadas concentrações, como é o caso do cobre e do manganês (Caussy et al., 2003). Para além disso, existem metais que não têm qualquer função biológica (não essenciais) e que são prejudiciais ao organismo podendo induzir efeitos negativos, tais como por exemplo o arsénio (As), o cádmio (Cd), o cobalto (Co), o crómio (Cr), o níquel (Ni), o chumbo (Pb) e o vanádio (V), que são potencialmente carcinogénicos (Leonard et al., 2004). Muitos metais tóxicos,

incluindo os metais carcinogênicos, seguem vias metabólicas de metais essenciais levando à indução de efeitos tóxicos (Goyer and Group, 2003). Isto ocorre, provavelmente, porque têm locais de ligação e características iônicas muito semelhantes (Goyer and Group, 2003).

1.2.1. Efeitos genotóxicos associados à exposição a metais e radionuclídeos

Estando a molécula de DNA presente em todas as células de todos os organismos vivos, qualquer alteração não programada que leve à sua desestabilização pode potencializar sérias consequências biológicas (Shugart, 2000). Alguns agentes ambientais químicos e/ou físicos são classificados como agentes genotóxicos, uma vez que têm a capacidade de interagir e modificar a estrutura do DNA causando dano (Lourenço et al., 2013c; Shugart, 2000). Sendo os metais e radionuclídeos agentes genotóxicos, a exposição a estes pode induzir uma série de danos no DNA (Shugart, 2000) podendo causar efeitos mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos, entre outros, levando à instabilidade genômica (Lourenço et al., 2013c).

O urânio é um metal emissor de partículas α , e a sua genotoxicidade resulta das suas propriedades radiológicas e químicas que variam com a sua composição isotópica (Darolles et al., 2010). A exposição de organismos ao urânio e outros metais tóxicos, pode induzir dano no DNA (Darolles et al., 2010) e afetar algumas vias moleculares, como o caso da reparação de DNA, metilação, replicação, regulação de fatores transcricionais nucleares, regulação da expressão gênica, apoptose, crescimento celular e induzir a formação de ROS (Lourenço et al., 2013c; Shugart, 2000). Alterações nestas vias moleculares pode resultar em modificações estruturais no DNA que levam ao aparecimento de mutações (somáticas ou germinativas) e, conseqüentemente, à disfunção da célula ou ao aparecimento de doenças (como o caso do cancro) (Li, 2008; Lourenço et al., 2013c; Rashi-Elkeles et al., 2011; Shugart, 2000). Para além disso, a radiação emitida pelo urânio (Darolles et al., 2010), também pode induzir uma série de danos no DNA, causados diretamente pela interação deste agente sobre a molécula de DNA ou indiretamente por formação de radicais reativos, levando a: quebras na cadeia de DNA (duplas e simples); surgimento de locais abásicos (também conhecido como locais apurínicos ou apirimidínicos (locais AP)); "mismatches"; ligações cruzadas DNA-DNA (intra ou entre cadeias) e/ou DNA-proteínas e aductos de DNA com metais (Figura10) (Cunniffe et al., 2007; FACHIN et al., 2009; Hada and Georgakilas, 2008; Lemos et al., 2017; Little, 2000; Sahbani et al., 2014; Shugart, 2000). De forma geral,

radiações de baixo LET, produzem danos no DNA pela formação de radicais livres, e as de alto LET produzem danos no DNA pela interação direta com a molécula (Harrison and Day, 2008; UNSCEAR, 2000).

A radiação é uma das ferramentas mais usadas para a terapia do cancro, no entanto é preciso compreender as respostas ao nível molecular, celular e tecidual, visto que é um dos muitos indutores exógenos de quebras de cadeia dupla no DNA e portanto potencial indutor de cancro (Rashi-Elkeles et al., 2011).

A quebra da cadeia dupla (DSB) é um dos tipos de danos mais comum da estrutura do DNA, e também a mais prejudicial, sendo que, a sua ocorrência depende da influência de: a) fatores externos, como o caso da exposição à radiação ionizante que vai ionizar diretamente a molécula de DNA; b) outros processos fisiológicos, como a replicação, que também têm a capacidade de induzir este tipo de dano (Cunniffe et al., 2007; Hada and Georgakilas, 2008; Larovaia et al., 2014; Pfeifer, 2010; Shugart, 2000; UNSCEAR, 2000). Posto isto, as células ativam uma resposta ao dano no DNA (DDR) que vai então induzir a paragem do ciclo celular ou a morte por apoptose. Após ativação da DDR, o dano é reparado maioritariamente por NHEJ (do inglês, “Non-homologous end joining”) e por HR (recombinação homóloga) (Genovese et al., 2006; Venkata Narayanan et al., 2017).

Os locais abásicos, ou AP, são um exemplo de dano que pode, indiretamente, levar a uma quebra de cadeia simples do DNA (SSBs). A perda de uma base, purina (local APurínico) ou pirimidina (local APirimidínico), do DNA pode resultar num “gap” temporário na molécula aquando da reparação do dano (Best, 1995; Shugart, 2000). Esta perda ocorre, principalmente, pela formação de radicais hidróxilos, provocados pela exposição a radiação ionizante e metais tóxicos (Wood et al., 1990). Quando uma SSB não é eficientemente reparada à um grande potencial para que se desenvolva uma DSB (larovaia et al., 2014). Por sua vez, uma DSB quando não é devidamente reparada pode surgir uma translocação cromossomal como consequência desta ineficiente raparação (Aten et al., 2004). As translocações cromossomais são produzidas pela interação entre dois terminais de diferentes cadeias de DNA (Aten et al., 2004; Larovaia et al., 2014). Isto ocorre porque o sistema de reparação não consegue ligar corretamente os dois terminais da cadeia, fazendo com que haja rearranjos cromossomais, envolvendo a troca de genes entre dois cromossomas não homólogos (Larovaia et al., 2014; Nambiar et al., 2008). Este tipo de rearranjo está na base de vários tipo de cancro, incluindo linfomas, leucemia, carcinomas e sarcomas (Nambiar et al., 2008).

Os “mismatches”, que se originam por incorporação incorreta de nucleótidos durante a síntese de DNA, são também um exemplo de modificação da estrutura do DNA (Li,

2008). Outra modificação desta estrutura são ligações cruzadas, em que se gera uma ligação covalente entre dois nucleótidos da mesma cadeia (“intrastrand crosslink”, em inglês) ou entre cadeias opostas (“interstrand crosslink”, em inglês) (Huang and Li, 2013). Para além deste tipo de ligações, temos ainda as ligações cruzadas DNA-proteína (DPCs), que devido ao seu tamanho são altamente tóxicas, uma vez que interferem com processos básicos da transcrição, como o desdobramento e síntese do DNA, inibindo-os (Stingele et al., 2017).

Por último, alguns agentes genotóxicos, como o caso dos metais, pode ligar-se covalentemente a macromoléculas celulares incluindo ácidos nucleicos e proteínas, sendo o produto desta reação designada de aducto (Shugart, 2000). Quando um químico se liga ao DNA pode provocar lesões que resultam numa replicação anormal, que poderá ser o início de uma mutação, que na ausência de uma reparação eficiente, pode dar origem a cancro (Figura 10) (Rajalakshmi et al., 2015).

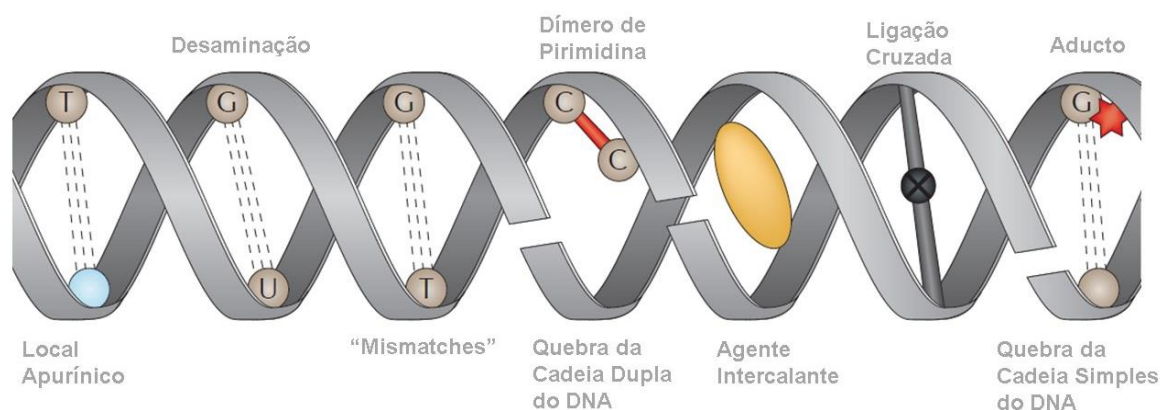


Figura 10 - Tipos de danos que podem ocorrer na molécula de DNA (Helleday et al., 2014).

Para além das modificações mencionadas, é importante realçar que a radiação ionizante tem uma grande capacidade de indução de danos no DNA em “cluster” (Sutherland et al., 2000). Um “cluster” é definido como, danos no DNA, com a mesma origem ou de origens diferentes, produzidos muito próximos uns dos outros na mesma cadeia, ou em cadeias opostas, do DNA (Asaithamby and Chen, 2012; Cunniffe et al., 2007; Hada and Georgakilas, 2008). Existem dois grupos de danos em “cluster”, os DSBs (onde se incluem os locais abásicos, as SSBs e as DSBs) e os não-DSBs (que podem ser uma mistura de modificações de bases e SSBs próximas umas das outras), sendo que a complexidade destes “clusters” varia consoante a deposição de energia da radiação, ou seja, quanto maior for o poder ionizante da radiação maior será a complexidade do “cluster” de danos (Asaithamby and Chen, 2012).

Tem sido bem demonstrado que um dano em “cluster” é mais difícil de reparar que um dano individual (Asaithamby and Chen, 2012). Portanto, a rede de sinalização DDR é essencial para a manutenção da estabilidade genômica e coordenação dos mecanismos de reparação do DNA (Malaquin et al., 2015). É importante realçar que alguns “clusters” podem ser um problema para a maquinaria de reparação do DNA e serem resistentes à reparação. Isto pode resultar numa persistência do dano por um tempo substancial após a irradiação, podendo levar a um aumento da frequência de mutações e à ocorrência de DSBs e SSBs aquando da síntese de DNA durante o ciclo celular (Cunniffe et al., 2007; Hada and Georgakilas, 2008; Harrison and Day, 2008). A resistência à reparação dos “clusters” de danos está relacionada com a existência de uma hierarquia na reparação dos danos, o que faz com que primeiro sejam reparadas lesões simples e só depois as mais complexas, sendo que, um atraso na excisão de uma lesão pode levar a mutações pela extensão do tempo de vida útil de outra lesão no “cluster” ou ao aparecimento de quebras na cadeia do DNA (Eccles et al., 2009). Estudos realizados com oligonucleótidos sintéticos onde inseriram vários tipos de dano de DNA mostraram que a eficiência da reparação de, por exemplo, um local AP pode ser reduzida significativamente pela presença de um segundo local AP ou de uma SSB, resultando numa extensão do tempo de vida útil da segunda lesão podendo dar origem a uma DSB (Asaithamby and Chen, 2012; Cunniffe et al., 2007). Como consequência disto, os “clusters” podem persistir durante a replicação do DNA durante o ciclo celular, uma vez que, o intervalo de tempo para a reparação do DNA no ciclo celular é pequeno (Ames et al., 1993; Eccles et al., 2009). Embora as células tenham a capacidade de repararem tanto DSBs como SSBs, esta reparação pode não ser perfeita (UNSCEAR, 2000). Desta forma, a eficiência da reparação dos “clusters” é dependente do tipo de lesões dentro do “cluster”, da distância entre lesões e da orientação relativa de uma lesão para outra (Cunniffe et al., 2007).

1.3. Biomarcadores de genotoxicidade

Um biomarcador é definido como uma alteração numa resposta biológica, que pode estar relacionada a uma exposição a um determinado tóxico ou ser um efeito de um determinado tóxico (Shugart, 2000). Outros autores definem biomarcador como variações bioquímicas, moleculares, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser medidas nos fluidos corporais, células ou tecidos, ou ao nível de todo o organismo, que providência evidências da exposição e/ou efeito a partir de um ou mais contaminantes tóxicos (Hagger et al., 2006; Lam and Gray, 2003; Oost et al., 2003). Estas alterações fornecem indicações de um desvio do estado normal que não é detetado num organismo

que não foi exposto (Oost et al., 2003). Os biomarcadores, em geral, podem ser classificados em três tipos: os de exposição, os de efeito e os de suscetibilidade (Hagger et al., 2006).

Num organismo ocorrem vários processos moleculares, celulares, bioquímicos e fisiológicos, sendo que uma alteração em qualquer um destes processos pode ser usada como um biomarcador (Hagger et al., 2006). A exposição a contaminantes ambientais, como o caso do urânio e dos seus radioisótopos descendentes, pode levar a efeitos letais e sub-letais, sendo estes últimos usados como biomarcadores (Lourenço et al., 2011a; Rodrigues et al., 2017). No entanto, o uso de biomarcadores moleculares providencia uma resposta precoce antes que outros efeitos sub-letais se manifestem, evidenciando sinais de exposição mesmo que os contaminantes tenham sido degradados ou não tenham sido detetados em análises químicas (Rodrigues et al., 2017). Devido a esta resposta imediata, estes biomarcadores têm sido propostos como ferramentas de detecção precoce (do inglês “early warning”) do efeito biológico (Lourenço et al., 2011a).

Posto isto, a análise de alterações da expressão genética de alguns genes, tornou-se uma poderosa ferramenta para o diagnóstico da existência de stresse e para analisar a resposta a stressores (Lourenço et al., 2013b). Análises da alteração da expressão genética de genes supressores de tumor e oncogenes têm sido efetuadas de forma a perceber se estas alterações podem ser consideradas bons biomarcadores de exposição à radiação ionizante (Daino et al., 2006; Guleria and Chandna, 2016; Lourenço et al., 2016, 2013a, 2013b; Quintens et al., 2015; Rashi-Elkeles et al., 2011; Wiese et al., 2012; Wingert and Rieger, 2016). Existem, portanto, algumas ferramentas que são usadas para este propósito como por exemplo “cDNA Microarrays”, “Real Time qPCR”, “pyrosequencing”, “expressed sequence tags (ESTs) sequencing” e “Suppression Subtractive Hybridization PCR (SSH)”, entre outras (Lourenço et al., 2013b).

1.3.1. Genes supressores de tumor

Os genes supressores de tumor codificam para proteínas cuja função é inibir a transformação celular e cuja inativação é vantajosa para o crescimento e sobrevivência de células tumorais (Oliveira et al., 2005). Estes genes são necessários para manter as células sob controlo, agindo como um travão molecular, que controla o normal crescimento celular, a replicação do DNA e a divisão celular (Vogelstein et al., 2000). Porém, quando estes genes são inativados, sucede-se um crescimento incontrolado, característico de células cancerígenas (Vogelstein et al., 2000). O conceito de supressor de tumor foi primeiramente validado por experiências em células somáticas híbridas,

demonstrando que a fusão entre células cancerígenas e normais resulta numa perda do fenótipo maligno (Oliveira et al., 2005). Existem dois grupos diferentes de genes supressores de tumor: os “gatekeepers” e os “caretakers” (van Heemst et al., 2007). Estes participam numa grande variedade de funções celulares como o caso da regulação do ciclo celular, da apoptose, bem como da diferenciação, sobrevivência da integridade genómica, reparação de danos no DNA, transdução de sinal e adesão celular (Oliveira et al., 2005). Os supressores de tumor “gatekeeper”, como é o caso dos genes *TP53* e *RB*, induzem morte celular ou paragem do ciclo celular de células potencialmente cancerígenas, sendo que a inativação destes genes contribui para a formação e progressão destas células (Oliveira et al., 2005; van Heemst et al., 2007). O gene *TP53* tem vários alvos, tais como os genes *CDKN1A* e *GADD45A* e portanto estes também se encontram inseridos nesta tipologia (Ryan et al., 2001; Salvador et al., 2013). Já os supressores de tumor “caretaker” são genes que protegem o genoma contra danos e mutações, ou seja, eles não regulam diretamente a proliferação de células tumorais, mas atuam como prevenção da instabilidade genómica (van Heemst et al., 2007). A sua inativação pode levar à inativação de “gatekeepers” e, conseqüentemente, levar a um aumento da ocorrência de mutações genómicas e à conversão de células normais em células neoplásicas (Oliveira et al., 2005; van Heemst et al., 2007). Para manter a estabilidade genómica são necessários vários “caretakers”, sendo o gene *ATM* um dos genes essenciais para fazer esta manutenção em resposta a DSBs provocados por radiação ionizante (IR) (Levitt and Hickson, 2002). Existe uma grande variedade de mecanismos que resultam na inativação destes genes, desde mutações intragénicas (que podem reprimir aspetos seletivos da função destes genes) a mutações “missense” (que reprimem a função total da proteína) e a mutações “nonsense” que previnem a síntese total da proteína (Oliveira et al., 2005).

Os genes supressores de tumor, bem como oncogenes, têm sido amplamente usados como biomarcadores de exposição à IR. Alguns dos genes utilizados são: *ATM*, *TP53*, *RB*, *CDKN1A*, *GADD45A*, *SET* e *FGF2* (Lourenço et al., 2013a, 2013b; Malaquin et al., 2015; Marie et al., 2012; Price et al., 2015; Wingert and Rieger, 2016).

1.3.1.1. Gene Supressor de Tumor “Caretaker”

1.3.1.1.1. Gene *ATM*

Algumas proteínas, implicadas na sobrevivência da célula ao dano no DNA e na ativação da paragem do ciclo celular quando é detetado o dano, pertencem à família das cinases 3-fosfatidilinositol, como o caso da ataxia telangiectasia mutada (*ATM*) e da *ATM*-

Rad3 (ATR) (Guleria and Chandna, 2016; Stracker et al., 2013; Yu, 2012). O nome da proteína ATM deve-se ao facto de a condição de Ataxia derivar de uma mutação no gene A-T que codifica para esta proteína cinase e que é a chave para a transdução de sinal ativada pela presença de danos no DNA (Roy et al., 2006; Yu, 2012). A Ataxia Telangiectasia, é uma condição rara de doença autossómica na qual os pacientes exibem uma série de problemas, tais como descoordenação muscular (ataxia), veias sanguíneas dilatadas e perto da superfície (telangiectasia), envelhecimento precoce, neurodegeneração, resistência à insulina, infertilidade, aumento da sensibilidade à IR, predisposição a cancro e várias imunodeficiências (Guleria and Chandna, 2016; Umesako et al., 2005). A exposição de células à IR pode ativar uma série de proteínas cinases, na qual a ATM é a mais proeminente, e que modifica a atividade de muitas outras proteínas nas vias de reparação do DNA (Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006). A proteína ATM tem um papel principal na sinalização celular em resposta a DSBs. Alterações nesta proteína ou na expressão do respetivo gene estão associadas ao desenvolvimento e progressão de uma série de cancros humanos (Kubota et al., 2014). O papel da ATM na resposta ao dano no DNA (DDR) reside na ativação de “checkpoints” do ciclo celular, como o caso do supressor de tumor *TP53* e de enzimas envolvidas na ativação da ATR (Stracker et al., 2013). A proteína ATR, tem funções semelhantes às da ATM, ou seja, ela ativa proteínas cinases serina/treonina (CHK1) iniciando uma cascata de sinalização que leva à culminação do ciclo celular. No entanto, o que difere uma proteína da outra é a cinética de ativação e os tipos de resposta a danos no DNA (Yu, 2012).

A ATR medeia apenas a resposta a SSBs persistentes, que usualmente ocorrem entre a deteção no DNA e a reparação por excisão nucleotídica (NER) e recombinação homóloga (HR) (Bhattacharya and Asaithamby, 2016; Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006; Yu, 2012). Já a ATM é a principal cinase que fosforila outras cinases nos motivos SQ (serina) ou TQ (treonina), sendo o primeiro

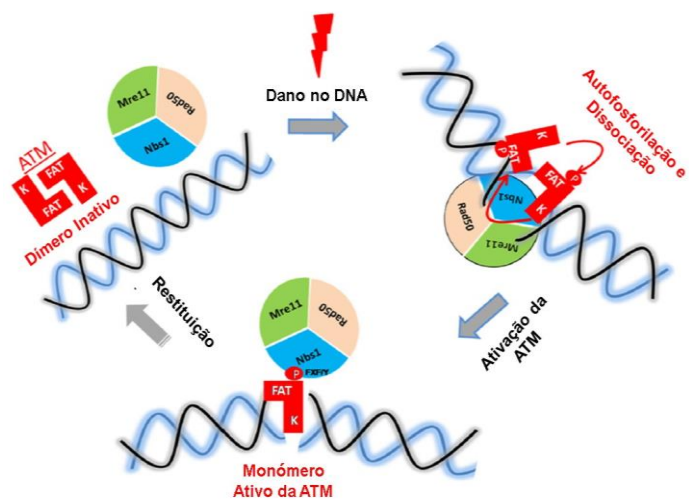


Figura 11 - Ilustração mostrando a ativação da proteína ATM (Guleria & Chandna, 2016).

transdutor da sinalização de eventos genotóxicos que levam à indução de DSBs (Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006; Guleria and Chandna, 2016; Stracker et al., 2013). No entanto, a ATM necessita de um mediador, sendo o complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) responsável por servir de sensor de DSBs recrutando a ATM para o local da quebra (Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006; Guleria and Chandna, 2016; Stracker et al., 2013). Para entender como é que o complexo MRN recruta a ATM para o local do dano é necessário esclarecer que a modulação da estrutura da cromatina influencia a radiosensibilidade, tornando-se evidente que o estado da cromatina tem um importante papel na ativação da ATM e regulação da sua atividade nos locais de quebra (Stracker et al., 2013). Assim sendo, é necessário que haja acetilação da lisina 3016 pela acetiltransferase TIP60, localizada no Mre11, para que a ATM se torne ativa em resposta a DSBs. Aquando do dano há dissociação desta acetiltransferase do ATF2 (fator de transcrição 2) levando a um aumento dos seus níveis o que leva, posteriormente, à ativação da ATM (Stracker et al., 2013). A proteína ATM é, então recrutada para o local de DSB, pelo complexo MRN, na forma de dímero inativo (Guleria and Chandna, 2016) e a sua interação com o terminal C do motivo FXF/Y da proteína NSB1 (do complexo MRN) leva a que haja monomerização e ativação desta cinase por um processo que requer uma autofosforilação (nos seus quatro resíduos S367, S1893, S1981 e S2996) através de outra molécula ATM (Guleria and Chandna, 2016; Stracker et al., 2013). Assim sendo, o

domínio cinase FAT, da molécula recrutada, fosforila outro domínio cinase FAT de outra molécula ATM tornando a primeira molécula ativa e levando à sua dissociação da segunda, formando monómeros de cinase ativos (Figura 11) (Guleria and Chandna, 2016). A ativação da ATM, na fase G₁ do ciclo celular, leva à fosforilação de três proteínas envolvidas no controlo da função da TP53 (p53 (serina15), a CHK2 e MDM2) (Committee to Assess Health Risks from Exposure to

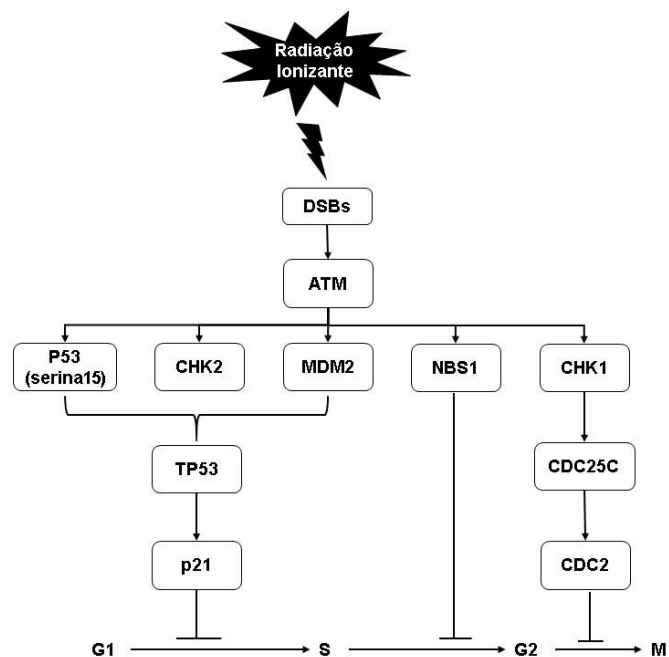


Figura 12 - Via de ativação de ATM por DSBs no DNA. As setas indicam vias de ativação. Adaptado de Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006.

Low Levels of Ionizing Radiation, 2006). O gene *TP53* é um dos primeiros alvos da ATM que fosforila o supressor de tumor na subunidade 15 (S15) (Stracker et al., 2013) levando à sua ativação e acumulação, uma vez que inibe a ligação da MDM2 à TP53. Consequentemente, há indução transcricional da p21 (CDKN1) que inibe a ciclina CDK-2E e causa a paragem da fase G₁ do ciclo celular (Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006; Venkata Narayanan et al., 2017). Na fase S, a ativação de ATM ocorre por fosforilação com a NBS1, levando à paragem do ciclo celular na fase S. Quanto à fase G₂ do ciclo celular, a ATM tem um papel crucial pois previne que as células em G₂ entrem em mitose após o dano no DNA através da indução da CHK1 que leva, posteriormente, à indução da CDC25C que por sua vez leva à indução da CDC2 (Figura 12) (Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006; Stracker et al., 2013).

1.3.1.2. Gene Supressor de Tumor “Gatekeepers”

1.3.1.2.1. Gene *TP53*

A proteína TP53 é um regulador chave de funções celulares incluindo respostas a sinais de stress e tem sido objeto de intensa investigação nos últimos dez anos por exercer um papel importante na defesa contra o desenvolvimento de cancro (Lee et al., 2007; Ryan et al., 2001). A proteína TP53 desempenha um papel fundamental no ciclo celular inibindo-o em caso de stress (genotóxico ou não) e prevenindo que as células em stress cresçam e sobrevivam; em muitos casos causando a morte programada (apoptose), como tentativa de conter os danos e proteger o organismo (Cheng et al., 2016; Meek, 2004; Ryan et al., 2001; Vogelstein et al., 2000).

O gene *TP53* foi descrito como gene supressor de tumor em 1979 (Vogelstein et al., 2000), estando localizado no cromossoma 17p13 (Oliveira et al., 2005). Este gene pode ser inativado diretamente como resultado de mutações, e indiretamente através da ligação a proteínas virais, ou como resultado de alterações em genes cujos produtos interagem com a TP53 ou transmitem informação para ou a partir da TP53 (Vogelstein et al., 2000). Normalmente, a atividade da TP53 é regulada através de interações com a proteína MDM2 (uma ubiquitina E3 ligase), que se trata de um regulador negativo que promove a ubiquitilação e destruição da TP53 (Lee et al., 2007; Meek, 2004; Vogelstein et al., 2000). A expressão do gene *MDM2* é estimulada pela TP53 e esta relação recíproca forma a base de um loop de “feedback” negativo (Meek, 2004). Assim sendo, a TP53 liga-se à região reguladora do gene *MDM2* estimulando a sua transcrição e tradução. Por sua vez, a proteína MDM2 vai então ligar-se à TP53 havendo estimulação

da adição de grupos de ubiquitina aos terminais carboxilos da TP53 fazendo com que esta seja degradada. Conseqüentemente, a concentração da TP53 baixa o que por sua vez vai causar redução da transcrição do gene *MDM2*, fechando assim o loop e levando, novamente, ao aumento dos níveis da TP53 (Vogelstein et al., 2000). Para além disso, a atividade da TP53 é também regulada por fosforilação pela ATM e pela CHK2 (Stracker et al., 2013).

A TP53 encontra-se em várias vias implicadas na regulação da sobrevivência celular e morte por apoptose, em resposta a danos genotóxicos e outros tipos de stress celular (tais como radiação UV, ROS, hipoxia, perda de crescimento normal e sinais de sobrevivência), prevenindo o crescimento de células potencialmente malignas (Cheng et al., 2016; Lee et al., 2007; Meek, 2004; Pfeifer, 2010). Posto isto, estudos recentes indicaram que a expressão do gene *TP53* funciona como um biomarcador para danos no DNA (Cheng et al., 2016), uma vez que uma única DSB pode ser o suficiente para aumentar os níveis da TP53 (Ryan et al., 2001; Vogelstein et al., 2000).

Um dano no DNA pode ativar a TP53 por duas vias: uma controlada pela Mre11 (proteína que pertence ao complexo MRN) e pela ATM, e outra controlada pela PK-DNA e CHK2. A Mre11 é essencial para a ativação da ATM que fosforila a TP53 reduzindo ligação à MDM2 e degradação da TP53 (Stracker et al., 2013; Yu, 2012). Como resultado disto, há um aumento dos níveis da TP53 que exerce a sua função por dois mecanismos diferentes: 1) ativação dos mecanismos de reparação de DNA e/ou promoção da paragem do ciclo celular, por ativação transcricional dos seus alvos; 2) promoção da morte por apoptose em casos em que o dano não pode ser reparado (Yu, 2012).

A TP53 possui alvos, muitos deles já identificados, que desempenham um papel importante nos efeitos a jusante da sua ativação, podendo levar à inibição do ciclo celular ou apoptose (Ryan et al., 2001; Vogelstein et al., 2000). A TP53 vai bloquear a divisão celular, estimulando diretamente a expressão do gene *CDKN1A* (inibidor de cinases dependentes de ciclina (CDKs)) (Ryan et al., 2001; Vogelstein et al., 2000), e do

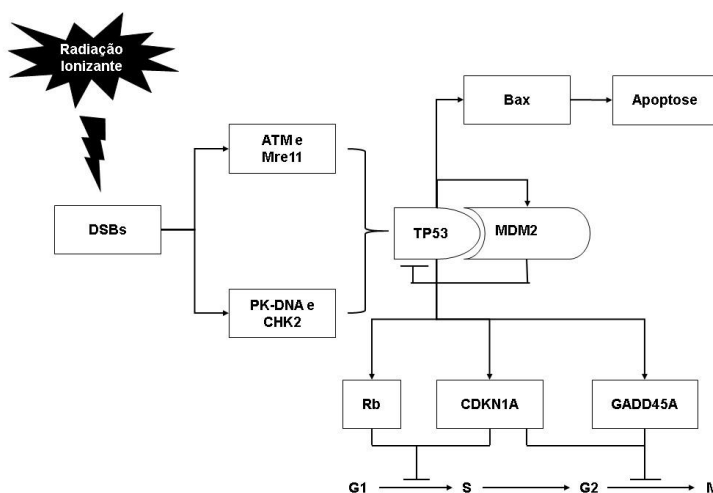


Figura 13 - Via de ativação da TP53. As setas indicam vias de ativação. Adaptado de Vogelstein et al., 2000.

gene *GADD45A*, que mantém a sinalização da TP53 por um loop de feedback positivo (Salvador et al., 2013). A ativação da p21 pela TP53 leva a que haja inibição de CDKs impedindo que o ciclo celular prossiga corretamente nas transições G1-S e G2-Mitose (Vogelstein et al., 2000). Para além disso, a ativação da TP53 também pode exercer um papel importante na ativação da pRB, uma vez que as CDKs são importantes para manter esta proteína inativa, e, assim sendo, uma inibição de CDKs pela p21 leva à ativação da pRB e, conseqüentemente, à paragem do ciclo celular em G1-S (Cazzalini et al., 2010; Henley and Dick, 2012). No caso da *GADD45A*, esta apenas medeia a paragem do ciclo celular em G₂/M (Salvador et al., 2013; Shan et al., 2012). Quanto ao processo de apoptose, existem inúmeros mediadores para a sua indução pela TP53 (Figura13) (Meek, 2004; Oliveira et al., 2005; Vogelstein et al., 2000).

1.3.1.2.2. Gene *RB*

O gene *RB* codifica para uma fosfoproteína nuclear que regula o ciclo celular estando localizado no cromossoma humano 13q14, e é composto por 27 exões (Conkrite et al., 2012; Miyamoto et al., 1995). O retinoblastoma é um cancro pediátrico que é iniciado por mutações em ambos os alelos do gene *RB* e que tem servido como um paradigma para a função dos genes supressores de tumores (Conkrite et al., 2012). Vários estudos têm revelado que a inativação do gene *RB* está implicado na patologia de uma variedade de cancros humanos, onde se inclui, para além do retinoblastoma, o osteossarcoma, cancro nos pulmões, próstata, e mama (Miyamoto et al., 1995).

A família de proteínas RB (pRb/p105, Rb2/p130 e p107/Rb1) está envolvida no controlo do ciclo celular, expansão clonal, paragem do ciclo celular, manutenção do estado pós-mitótico, bem como resposta a danos no DNA, apoptose, diferenciação, quiescência e senescência (Genovese et al., 2006; Narasimha et al., 2014; Thangavel et al., 2014). Esta família está envolvida em vias reguladoras compostas por outros fatores, como p16, p21 (CDKN1A), p27, CDK2, CDK4/6, ciclina A/E e a ciclina D (Genovese et al., 2006). Para além disso, a via de ativação da TP53 também exerce um papel importante no retinoblastoma humano (Conkrite et al., 2012) uma vez que um dos seus alvos é a p21 que inibe complexos CDK (Cazzalini et al., 2010), essenciais para manter a pRb inativa (Oliveira et al., 2005).

A pRB existe, na célula, em três formas: (1) pRB não fosforilada; (2) pRB hipofosforilada (forma ativa da proteína em células quiescentes, formando um complexo repressivo de transcrição no promotor do gene E2F para inibir o ciclo celular) e (3) pRB hiperfosforilada (forma inativa) (Narasimha et al., 2014). Ao longo do ciclo celular e em

resposta a danos no DNA, a pRB altera a sua forma ativa para inativa dependendo de eventos de fosforilação a partir de vias de sinalização a montante (Oliveira et al., 2005), que envolvem CDKs (Henley and Dick, 2012).

A pRB contém 15 locais de fosforilação CDK nos loops entre ou depois das estruturas A'/B' e dos domínios A/B (Narasimha et al., 2014). Durante a progressão do ciclo celular, a pRB vai sendo gradualmente fosforilada e inativada pelos complexos CDK, causando a separação da pRB do E2F, deixando que o ciclo celular prossiga na sua normalidade (Oliveira et al., 2005).

Por outro lado, por exemplo, uma inibição da CDK4/6, por sinais inibitórios de crescimento, leva à ativação da pRB que se liga ao fator de transcrição E2F, que é responsável pelo controlo da expressão de vários genes necessários para que a célula

entre na fase S do ciclo celular, inibindo-o (Henley and Dick, 2012). A inibição deste fator e o recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina leva a um bloqueio da progressão do ciclo celular, de G1 para S (Figura 14) (Conkrite et al., 2012; Henley and Dick, 2012; Narasimha et al., 2014; Oliveira et al., 2005; Thangavel et al., 2014).

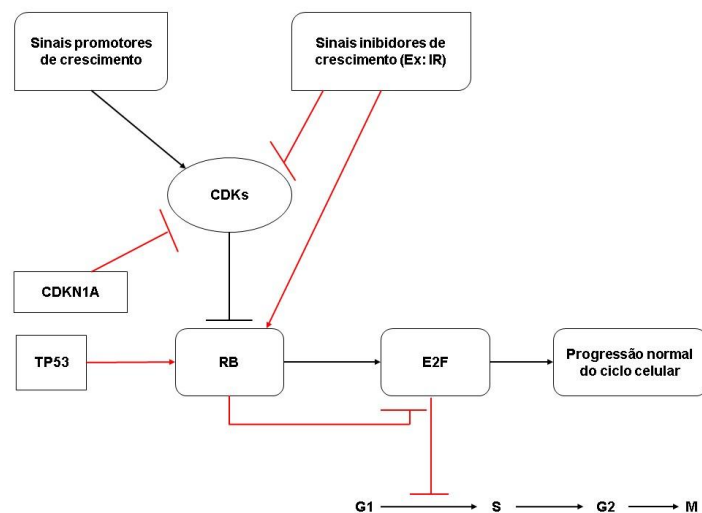


Figura 14 – Via de ativação/inibição da pRB. As setas correspondem a mecanismos de ativação. A vermelho encontram-se a via de ativação da pRB e a preto a via de inibição da pRB. Adaptado de Henley and Dick, 2012.

1.3.1.2.3. Gene *CDKN1A*

O gene *CDKN1A* codifica para a proteína p21^{CDKN1A}, que é um importante alvo transcripcional da TP53, contribuindo para a resposta celular a danos no DNA (DDR) por regulação de processos fundamentais, tais como: progressão do ciclo celular, apoptose, transcrição e/ou expressão genética e inibição da replicação do DNA por interação direta com PCNAs (antigénios nucleares de proliferação celular) e complexos CDKs (Besson et al., 2008; Cazzalini et al., 2010; Choudhury et al., 2007; Wiese et al., 2012). A proteína CDKN1A é um membro da família de inibidores de CDK, CIP/KIP, que inibe ciclinas D, E e A dependentes de cinases (Besson et al., 2008; Wiese et al., 2012).

No caso da regulação do ciclo celular, a p21 é o principal mediador da paragem do ciclo celular em DDR, não só pela inativação das CDKs na fase G1 (graças à interação direta através de sequências específicas nos domínios de terminais N da proteína), como também através de outros processos, que incluem a interação direta com PCNA inibindo a replicação do DNA, e a interação indireta com outros reguladores de ciclo celular (Cazzalini et al., 2010).

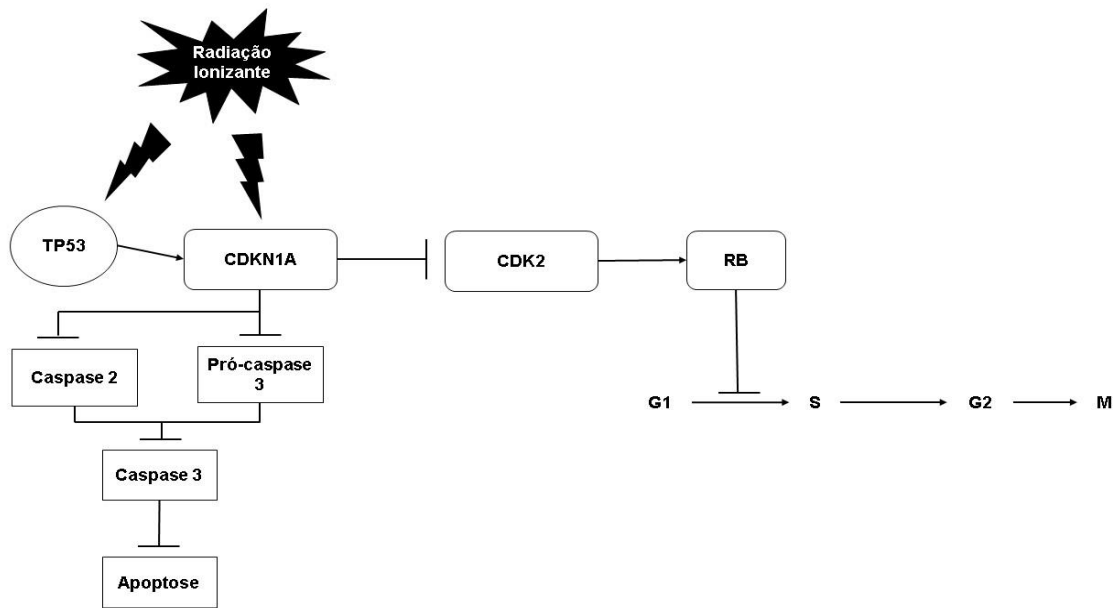


Figura 15 – Via de sinalização de *CDKN1A*. Adaptado de Besso et al. 2008 e Cazzalini et al. 2010. As setas indicam vias de ativação.

A p21 inibe a progressão do ciclo celular através da inibição da atividade da CDK2 que é essencial para manter a pRB inativa, levando à sua ativação e ligação desta ao fator E2F, e conseqüentemente, à paragem do ciclo celular (Abbas and Dutta, 2010). Para além disto, a p21 tem também mostrado ter um papel importante na manutenção da paragem da fase G2 através de vários mecanismos (Figura15) (Cazzalini et al., 2010).

Quanto à apoptose, foi recentemente descoberto que a p21, para além de promover a apoptose em caso do dano no DNA não ser reparado, pode também inibir a apoptose, através da sua interação com vias de sinalização de stress, ativando-as (Abbas and Dutta, 2010; Cazzalini et al., 2010). Por exemplo, a p21 pode interagir com a pro-caspase 3, isto é, o precursor inativo da caspase 3, através do seu primeiro terminal N. Quando ligada à p21, a pró-caspase 3 inativa não pode ser convertida para a sua forma ativa e a apoptose é, então, inativada (Besson et al., 2008; Cazzalini et al., 2010). A caspase 2, que atua a montante da caspase 3 é mantida no seu estado repressivo pela p21 (Figura 15) (Cazzalini et al., 2010). A p21 pode também prevenir a apoptose mediada por outras vias de sinalização, em dois níveis diferentes: (1) no citoplasma, a p21 liga-se à MAPKKK

ASK1/MEKK5 inibindo a MAP cinase e, conseqüentemente, a apoptose; (2) a p21 pode ligar-se à cinase JNK através do seu domínio ciclina-CDK, que inibe a atividade de JNK e previne a ativação de cinases a jusante (Besson et al., 2008). Assim sendo, a propriedade anti ou pró-apóptica da p21 vai depender da natureza do estímulo apoptótico (Cazzalini et al., 2010). Isto demonstra o seu papel paradoxal como potencial indutor de oncogênese, ou seja, a expressão deste gene, dependendo do contexto celular e das circunstâncias, pode assumir funções de supressor de tumor ou de oncogene (Abbas and Dutta, 2010).

Para além do papel na apoptose, a p21 executa um papel importante na regulação de outro tipo de morte celular, a autofagia. Na autofagia há formação de vesículas que engolfam e consomem os componentes celulares. Aqui, a p21 contribui para a manutenção das proteínas autofágicas no seu estado inativo (Cazzalini et al., 2010).

Por fim, no caso da regulação da transcrição, a p21 executa a sua função através de diferentes mecanismos: (1) pode reprimir a transcrição por inibição do complexo ciclina-CDK; (2) pode ligar-se diretamente a vários fatores de transcrição e inibir a sua atividade; (3) ou pode, ainda, funcionar por inibição dos domínios de repressão transcrricional de co-ativadores transcripcionais (Cazzalini et al., 2010). De acordo com o primeiro mecanismo, a inibição de CDK previne a fosforilação de proteínas da família RB, inativando assim a transcrição do E2F. Através do segundo mecanismo, a função da p21, como cofator transcrricional, é regular a atividade de diferentes proteínas de ligação ao DNA como NF-Kb, Myc, E2F, p300, STAT3, e recetores de estrogénio. Por fim, o terceiro mecanismo ocorre via interação com co-ativadores transcripcionais, como p300 ou CBP (Cazzalini et al., 2010).

1.3.1.2.4. Gene *GADD45A*

O gene *GADD45A* pertence a uma família de 3 genes, *GADD45A*, *GADD45B* e *GADD45G*, que são expressos em resposta a danos no DNA (Tamura et al., 2012; Wingert and Rieger, 2016; Yang et al., 2013). Os membros desta família, possuem um tamanho pequeno (cerca de 18kD) e estão localizados tanto no núcleo, como no citoplasma, regulando algumas funções que incluem a progressão e paragem do ciclo celular, sobrevivência e morte celular, bem como reparação do DNA e modificações epigenéticas (Tamura et al., 2012; Wingert and Rieger, 2016). Devido a estas ações pleiotrópicas, as proteínas *GADD45* regulam os mecanismos biológicos celulares básicos, com implicações no desenvolvimento, regeneração, envelhecimento e doença (Wingert and Rieger, 2016).

A proteína GADD45A é importante na proteção contra a carcinogénese, regulando negativamente as células malignas (Shan et al., 2012; Yang et al., 2013). Esta proteína é um supressor de tumor sob controlo transcricional da TP53 e da p38, funcionando como um loop de feedback positivo que mantém a sinalização da TP53 e paragem do ciclo celular após um dano no DNA (Figura 16) (Salvador et al., 2013). A sua expressão é iniciada por uma variedade de agentes genotóxicos, tais como irradiação UV, raio X, IR, para além de outros stressores celulares (Wingert and Rieger, 2016). Posto isto, a proteína GADD45A tem um papel importante face a stresses genotóxicos e não-genotóxicos, estando envolvida em muitos processos, tais como, reparação do DNA, atraso do ciclo celular, promoção da apoptose e estabilização genómica (Shan et al., 2012; Tamura et al., 2012; Wingert and Rieger, 2016; Yang et al., 2013).

Como se observa na figura 16, a paragem do ciclo celular ocorre por interação desta proteína com a cinase CDK1, levando à dissociação do complexo CDK1/ciclinaB1, e por mediação da paragem do ciclo celular em G₂/M e fase S, através da estimulação da transcrição de c-Jun e NCOA2 (Salvador et al., 2013). Por outro lado, a proteína GAAD45A está envolvida em vias de reparação do DNA, através da interação desta proteína com PCNAs ou através da interação com APE (endonuclease apurínica/apirimidína), mantendo a estabilidade genómica. Para além disso, a GADD45A pode induzir a apoptose por promoção da translocação de Bim (uma proteína pro-apoptótica da família Bcl-2) para a mitocôndria, através da interação com o fator de alongamento1A (EF-1A) do citoesqueleto, ativando a libertação do citocromo C para o citoplasma e iniciando o processo de apoptose (Salvador et al., 2013; Shan et al., 2012).

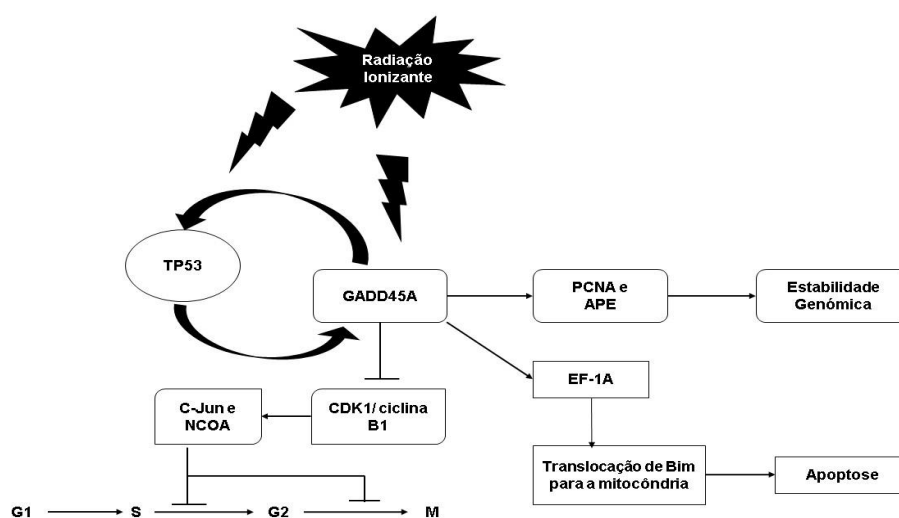


Figura 16 - Proteínas envolvidas na regulação do gene *GADD45A* e os seus alvos genéticos. A setas indicam uma regulação positiva. Adaptado de Salvador et al., 2013.

1.3.2. Oncogenes

1.3.2.1. Gene SET

A proteína codificada pelo oncogene *SET* (TAF-1/I₂PP2A), um inibidor da proteína fosfatase 2A (PP2A), é uma fosfoproteína que está implicada em muitos processos celulares como o controlo da progressão do ciclo celular, a replicação do DNA, a remodelação da cromatina, a transcrição genética, apoptose, migração e diferenciação celular e regulação epigenética (Cristóbal et al., 2012; Switzer et al., 2011). Este gene tem um papel chave em várias vias que levam à progressão de tumores quer por inibição da proteína supressora de tumor PP2A (proteína fosfatase 2A) quer por inibição do supressor de metástase nm23-H1 (Cristóbal et al., 2012; Li et al., 1996; Switzer et al., 2011). O gene *SET*, ou também conhecido como inibidor 2 da PP2A não é o único capaz de inibir a função da PP2A, o I1PP2A e o CIP2A também são inibidores desta proteína (Oaks and Ogretmen, 2015).

A sobre-expressão do gene *SET* tem sido observada em várias neoplasias incluindo a Leucemia Mieloide Crónica (CML), na qual correlaciona-se com a expressão e atividade da oncoproteína BCR/ABL, levando à inibição da PP2A (Cristóbal et al., 2012; Oaks and Ogretmen, 2015). A proteína PP2A, é um supressor de tumor que regula negativamente muitas vias de sinalização pró-crescimento ou pró-sobrevivência associadas com a progressão cancerígena, tais como Akt, β -catenina e c-Myc (Switzer et al., 2011). No entanto, a sua inibição pela proteína SET, através da ligação direta ao seu domínio catalítico, tem levado à progressão do tumor em pacientes com CML (Cristóbal et al., 2012; Oaks and Ogretmen, 2015). Foi descrito, recentemente, que o silenciamento do gene *SET*, em pacientes portadores desta doença, leva à restauração da atividade da PP2A e à redução da atividade da BCR/ABL. Por outro lado, a ligação direta de uma ceramida ou esfingosina

FTY720, ou ambas, ao SET leva a que este liberte a PP2A, levando a que esta possa exercer as suas funções de supressor de tumor (Figura 17) (Oaks and Ogretmen, 2015). Para além de formar um complexo

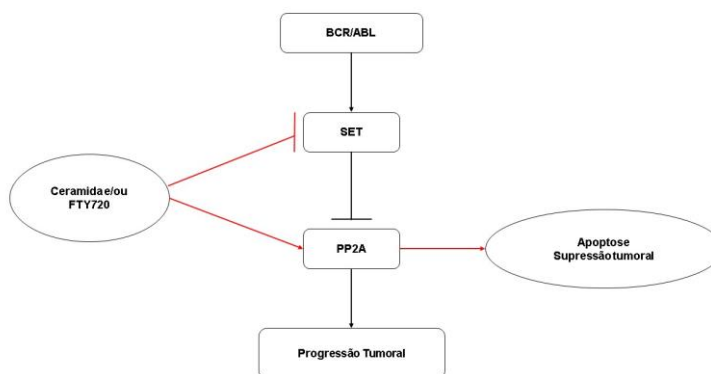


Figura 17 - Via de regulação de SET-PP2A em CML. Adaptado de Oaks and Ogretmen, 2015. A preto encontram-se a via de ativação de SET e a vermelho a via de inibição.

proteína SET também forma um complexo inibitório com o supressor de metástase nm23-H1 sequestrando-o para o citosol, o que previne assim a sua atividade exonuclease promovendo a formação da metástase (Switzer et al., 2011).

1.3.2.2. Gene *FGF2*

O gene *FGF2* é um membro da família de fatores de crescimento fibroblástico, que estimula o crescimento de vários tipos celulares, desde fibroblastos a células tumorais, e cuja proteína é produzida por células estromais da medula óssea e fagócitos maduros (Ono et al., 2012; Shah et al., 2012). Faz parte de uma ampla família de moléculas neurotróficas que estão envolvidas no desenvolvimento do cérebro, neurogênese adulta e plasticidade regenerativa (Graham and Richardson, 2010). É sintetizado como um precursor de 155 aminoácidos e subseqüentemente processado para uma forma madura que consiste em resíduos de 146 aminoácidos, localizados no espaço extracelular (Ono et al., 2012). Na medula óssea, o fator FGF2 tem um papel importante na expansão de populações celulares progenitoras hematopoiéticas (Shah et al., 2012).

A proteína FGF2 medeia a transdução de sinais celulares através da sua ligação a recetores de tirosina cinase de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFRs), controlando eventos como a padronização da mesoderme no embrião (Ono et al., 2012; Shah et al., 2012). Juntos levam a um desenvolvimento crucial de vias de sinalização, que são responsáveis por muitas funções, que incluem a proliferação celular, sobrevivência, migração e angiogênese (Turner and Grose, 2010). Para além destas funções, as vias de sinalização FGF têm sido implicadas no desenvolvimento e progressão de células cancerígenas, uma vez que, estas moléculas estão suscetíveis a “hijack” por parte de células cancerígenas, levando o FGF2 a ter um papel oncogénico em muitos cancros (Korc and Friesel, 2009; Turner and Grose, 2010). O fator FGF2 tem sido expresso em muitos tumores malignos incluindo melanomas, astrocitomas e cancro da mama, pâncreas, NSLC (do inglês, “Non-small Lung Cell”) bexiga, próstata e carcinoma hepatocelular (HCC) (Korc and Friesel, 2009).

Uma excessiva proliferação é uma das características do cancro e muitos estudos têm demonstrado que a sinalização FGF promove a proliferação de células tumorais. Contudo, os mecanismos envolvidos na resposta à sinalização FGF diferem dependendo do contexto (Turner and Grose, 2010). As vias de sobrevivência de células tumorais são um mecanismo adaptativo pelo qual o tumor é resistente às defesas naturais de um organismo (Korc and Friesel, 2009). Neste caso, a sinalização de FGF tem o potencial, dependendo do tipo celular, de ativar vias anti-apoptóticas através quer da ativação de

PI3K-AKT, quer da sinalização de STAT, em vários tipos de cancro, como é o caso do cancro da mama, bexiga e próstata (Korc and Friesel, 2009; Turner and Grose, 2010). Para além disso, vários estudos demonstram que o fator FGF2 medeia efeitos citoprotetivos por sobre-regulação da expressão de proteínas anti-apoptóticas como o caso da BCL-2, BCL-X, do inibidor de apoptose X (XIAP), e do inibidor de apoptose 1 (IAP1) através de uma cinase S6 (Turner and Grose, 2010). Em adição aos efeitos mencionados acima, a sinalização por FGF pode promover a migração e invasão celular de diversas formas. Por exemplo, em neoplasias prostáticas intraepiteliais, a ativação e expressão do FGFR1 resulta no fenótipo EMT (Transição Epitélio-Mesenquimal, do inglês “Epithelial-Mesenchymal Transition”) que é um processo onde as células epiteliais adquirem motilidade, tendo um papel extremamente importante na progressão cancerígena e metástase (Korc and Friesel, 2009; Turner and Grose, 2010). EMT faz a disrupção das ligações célula-célula promovendo a invasão de células tumorais, e portanto, a ativação da sinalização do FGFR1 pode promover quer o desenvolvimento de cancro quer da metástase (Turner and Grose, 2010). No caso da angiogénese, ela é a chave para os processos de reparação fornecendo nutrientes e oxigénio para o consumo energético do processo de remodelação tecidual. Aqui, o fator FGF2 é conhecido por ser importante para o crescimento e maturação de novos vasos sanguíneos nos tecidos. No entanto, este fator também pode estar implicado na angiogénese tumoral, uma vez que, se um tumor crescer mais que 1mm^3 e metastizar, ele deve estabelecer o seu próprio suplemento de sangue para fornecimento de oxigénio e nutrientes (Turner and Grose, 2010).

1.4. Organismos modelo como indicadores biológicos de poluição ambiental

Os bioindicadores incluem processos biológicos, espécies ou comunidades que são usados para avaliar a qualidade do ambiente, as suas alterações ao longo do tempo, bem como os potenciais efeitos destes fatores na espécie humana (Holt and Miller, 2010; Parmar et al., 2016). As alterações no ambiente são atribuídas a distúrbios antropogénicos ou naturais, no entanto, os distúrbios antropogénicos são o principal fator para a utilização de bioindicadores em estudos científicos (Holt and Miller, 2010). Através do uso de bioindicadores podemos prever o nível de contaminação ou o estado natural de uma determinada região (Parmar et al., 2016). Desde 1960 que se faz recurso a bioindicadores em diversos estudos, no entanto nem todas as espécies, processos biológicos ou comunidades são bons bioindicadores, para tal é preciso que estes

apresentem tolerância moderada à variabilidade ambiental (Holt and Miller, 2010). O recurso a bioindicadores permite-nos: determinar um determinado impacto biológico, monitorizar os impactos sinérgicos e antagonísticos de vários poluentes, e monitorizar os efeitos prejudiciais de tóxicos para humanos, tal como para outros seres vivos (Parmar et al., 2016).

A monitorização ambiental dos efeitos genotóxicos requer a seleção de organismos indicadores (Lourenço et al., 2013a). Os mamíferos são os organismos mais usados em estudos radiobiológicos (Lemos et al., 2017). Os mamíferos pequenos têm sido preferencialmente selecionados, uma vez respondem de forma sensível a várias alterações nos ecossistemas terrestres (Festa et al., 2003; Mukhacheva et al., 2010). Para além disso, os pequenos mamíferos, como os roedores, têm sido usados como espécies para monitorização da exposição a contaminantes, uma vez que, permitem uma melhor avaliação dos efeitos em consumidores de elevada complexidade biológica e, portanto, possibilitam a deteção de um possível risco para a saúde humana (Lourenço et al., 2013a; Marcheselli et al., 2010). Uma vez que os mamíferos são filogeneticamente próximos dos humanos os efeitos sub-letais detetados nestes organismos podem, muito provavelmente, também ocorrer em humanos. Para que pequenos mamíferos sejam usados como indicadores de poluição, estes devem cumprir alguns critérios como: elevada abundância; baixa taxa de migração e uma longevidade razoável (Marcheselli et al., 2010).

O coelho, *Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758, é um animal modelo comum que tem sido usado em vários estudos, uma vez que são filogeneticamente mais próximos dos primatas do que dos roedores e têm um tamanho razoável que permite monitorizar mudanças fisiológicas não letais (Figura 19) (Yin et al., 2015). Por outro lado, o coelho é um animal que faz parte da dieta de várias pessoas em alguns países (Foote and Carney, 2000), o que pode possibilitar de transferência de contaminantes através da cadeia alimentar, podendo potencialmente expor a população humana.



Figura 18 - *Oryctolagus cuniculus*. Fonte: veterinaria-atual.pt.

1.5. Objetivos da Tese

Os resíduos resultantes do processo de extração de urânio contêm não só radionuclídeos, da cadeia de decaimento do urânio, como também metais tóxicos. A

exposição a estes contaminantes tornou-se uma preocupação quer para o ambiente quer para a população residente na periferia destas minas, uma vez que, a maior parte dos isótopos de urânio decai por emissão de radiação α (que é bastante ionizante provocando danos nos organismos quando inalada ou ingerida) e que os metais tóxicos existentes podem levar à formação de ROS o que, conseqüentemente, pode provocar dano no DNA. Assim, a realização de estudos de avaliação de riscos associados a esta exposição tornou-se bastante importante. Esta tese faz parte de um estudo realizado na mina de urânio da Cunha Baixa. Nesta área mineira, assim como na aldeia adjacente com o mesmo nome, foi detetada a contaminação dos lençóis freáticos e conseqüentemente dos poços e terrenos de cultivo a jusante. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo principal avaliar riscos que resultam do consumo de alimentos e água provenientes de terrenos e de poços contaminados, quer para a saúde humana quer para outros organismos, que vivam ou que sejam criados perto de minas de urânio. Para alcançar este objetivo, foi feita a análise da expressão de sete biomarcadores genéticos normalmente associados à resposta à exposição à radiação. Foi estudada a expressão de cinco genes supressores de tumor (*ATM*, *TP53*, *Rb*, *CDKN1A* e *GADD45A*) e dois oncogenes (*SET* e *FGF2*), em três órgãos (pulmão, fígado e rim) de coelho, após 1 mês e 3 meses de exposição.

Com este estudo pretende-se:

- Avaliar alterações genéticas decorrentes da exposição a estes contaminantes;
- Perceber ao fim de quanto tempo de exposição se observaram diferenças significativas na expressão destes genes nos três órgãos e qual o melhor órgão para fazer este tipo de análise;
- Perceber qual/quais gene(s) respondem melhor e mais rapidamente e que, por isso, podem ser melhores biomarcadores, no contexto de exposição a metais e baixas doses de radiação;
- Perceber se há ativação de genes envolvidos na resposta a danos moleculares ou indução de danos no DNA;
- Por fim, perceber se essas alterações são diferentes daquelas que têm sido observadas para estes genes em resposta apenas a baixas doses de radiação.

Capítulo 2 – Material e Métodos

2.1. Exposição e Amostragem

Numa casa situada próximo da mina desativada pertencente a residentes da aldeia da Cunha Baixa, que aceitaram colaborar com a nossa equipa, foi construída uma capoeira que foi ocupada por um total de dez organismos, pertencentes à espécie *Oryctolagus cuniculus* Linnaeus 1758 (Coelho comum), durante um período máximo de 3 meses. Durante este período de tempo, os animais foram alimentados com legumes e vegetais cultivados nos terrenos localizados a jusante da mina e que, por isso, estavam contaminados por metais e radionuclídeos. Os terrenos de cultivo pertencem aos residentes acima mencionados e estão localizados junto à casa onde estava a capoeira. De igual forma, a água provinha de poços desses mesmos residentes, também contaminados, e que eram utilizados em tempos para irrigação dos terrenos. Os animais controlo foram criados da mesma forma que os animais da zona contaminada (também com produtos cultivados localmente e com água de poços), na aldeia do Barril (concelho de Mortágua) situada a 70 Km da aldeia da Cunha Baixa e sem qualquer registo de atividade mineira de qualquer natureza. Após 1 e 3 meses de exposição, os animais (expostos e controlo) foram sacrificados, tendo sido recolhidas e preservadas amostras de três órgãos (pulmão, fígado e rim). As amostras foram posteriormente utilizadas para a análise de alterações na expressão dos genes supressores de tumor e oncogenes.

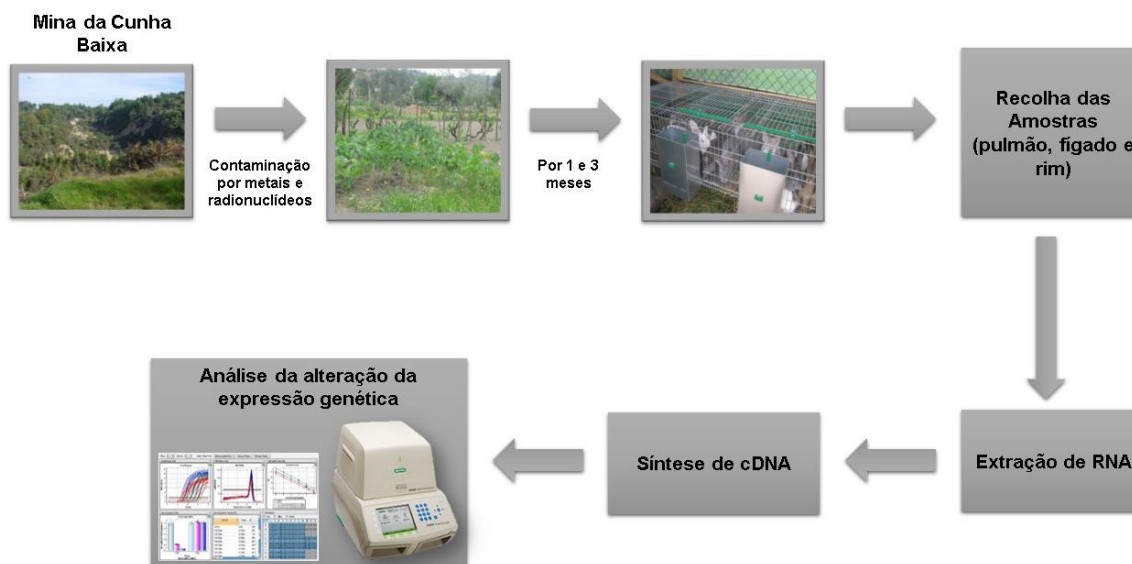


Figura 19 – Desenho experimental do presente estudo.

2.2. Análise da concentração de radionuclídeos em amostras de água

Como descrito na secção anterior, foi fornecido aos organismos pertencentes à espécie *Oryctolagus cuniculus* água que provinha de um poço de uma residência localizada perto da mina desativada da Cunha Baixa, durante um período máximo de três meses. Para determinar a concentração de radionuclídeos presentes na água foram realizadas análises químicas de acordo com o protocolo descrito em Lourenço et al., 2017. A análise foi executada pelo Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C2TN) no Instituto Superior Técnico (IST) em Lisboa.

Primeiramente, a amostra da água do poço foi filtrada através de uma membrana de nitrato de celulose com poros de tamanho de 0,45µm. De seguida a amostra foi acidificada com HNO₃ ultrapuro a pH<2. Para determinar as atividades dos isótopos ²³⁸U, ²³⁵U, ²³⁴U, ²³⁰Th, ²³²Th, ²²⁶Ra, ²¹⁰Pb e ²¹⁰Po estável, foram adicionados marcadores isotópicos internos com atividades conhecidas (²³²U, ²²⁹Th, ²²⁴Ra e 10 mg de Pb²⁺). Estes marcadores permitem determinar o rendimento radioquímico de cada elemento no final de uma extração sequencial e medição por espectrometria alfa. Após a adição destes marcadores internos, foi adicionado um pequeno volume de KMnO₄ (um oxidante) e a amostra foi agitada durante a noite para garantir uma mistura isotópica e um ajustamento do estado de oxidação de cada marcador, bem como dos isótopos naturais da amostra. Seguidamente, foi adicionado MnCl₂ dissolvido, agitou-se a amostra, e aumentou-se o pH com adição de hidróxido de cálcio para obter a co-precipitação dos radionuclídeos com o MnO₂. O precipitado resultante, foi recolhido por centrifugação e dissolvido com ácido clorídrico (HCl), sendo que, os radionuclídeos, presentes no precipitado dissolvido, foram separados e purificados com o recurso a colunas de troca iónica e os radioelementos purificados foram colocados em discos de aço inoxidável. No caso do polónio (²¹⁰Po) foi utilizado discos de prata para deposição espontânea deste. As fontes de radiação alfa foram contabilizadas por espectrometria alfa com recurso ao espectrómetro alfa OctectPlus (ORTEC EG&G) com detetores iónicos de Si (Silício) inseridos. As medições obtidas foram analisadas e os resultados, dos radionuclídeos dissolvidos, foram fornecidos em unidades de concentração em atividade, mBq/L.

2.3. Preservação dos tecidos e extração de RNA total

Para uma correta preservação dos tecidos animais e estabilização do RNA para análises genéticas posteriores, as amostras foram conservadas em RNAlater™ (QIAGEN, USA). Desta forma, as amostras de pulmão, fígado e rim foram submersas no reagente de estabilização, numa proporção de 10µL de reagente para 1 mg de tecido, e armazenadas a -20°C. A estabilização imediata do RNA, após a colheita, é um pré-

requisito para a preservação das amostras biológicas uma vez que, pode ocorrer degradação do RNA, bem como indução transcricional o que, posteriormente, pode alterar os padrões de expressão genética.

O RNA total foi extraído com o kit RNeasy mini kit™ (QIAGEN, USA). Para tal, as amostras de tecido (cerca de 30mg) foram maceradas com tampão de lise (RLT), suplementado com β-mercaptoetanol (por forma a desnaturar as RNases durante a lise celular), provocando a disrupção do tecido e libertação dos ácidos nucleicos. Posteriormente, é adicionado um volume equivalente de etanol (a 70% para os tecidos de pulmão e rim e a 50% para tecidos de fígado, pois o uso desta concentração pode aumentar a quantidade de RNA extraído a partir de amostras de fígado) ao lisado limpo para facilitar a ligação do RNA à matriz da coluna. Após a adição do etanol a solução é homogeneizada por pipetagem. De seguida, a solução obtida é adicionada à coluna sendo esta posteriormente centrifugada, fazendo a amostra passar pela coluna e permitindo a ligação do RNA à matriz. Durante este processo de extração é feito um tratamento com DNase I na coluna (DNase PureLink™ Invitrogen, USA) por forma a remover eficientemente o DNA genómico que possa estar presente na amostra. A DNase I é depois removida nos passos de lavagem que se seguem. O restante protocolo consiste em sucessivas centrifugações com tampões de lavagem para remover possíveis contaminantes. No final das lavagens, adicionou-se água livre de RNases para eluir o RNA presente na coluna. No final do protocolo obtém-se, por centrifugação, um volume final de 50µL de RNA extraído, que é posteriormente armazenado a -80°C para que não sofra degradação. A quantificação do RNA, foi efetuada com o fluorómetro Qubit™ (Invitrogen, USA). A qualidade do RNA extraído foi determinada pela observação da qualidade das bandas 18S:28S num gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (EtBr). Ao gel de agarose foram

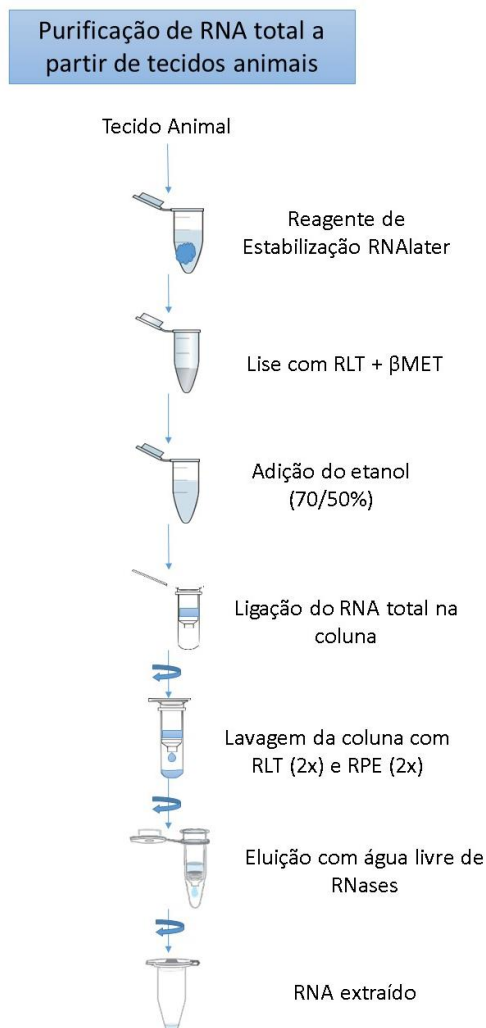


Figura 20 - Esquema do protocolo de estabilização e extração do RNA. Adaptado do RNeasy® Mini Handbook de 2012.

adicionados 360µL de lixívia para desnaturação do RNA e destruição de RNases, o que limitou a ocorrência de qualquer degradação do RNA durante a eletroforese permitindo uma melhor visualização das bandas. Para analisar a pureza do RNA extraído e para detetar uma possível contaminação por compostos orgânicos (provenientes do processo de extração), foram determinadas as razões 260/280 (pureza) e 260/230 (contaminação por compostos orgânicos) usando o espectrofotômetro Nanodrop™ ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA).

2.4. Síntese de cDNA

O DNA complementar do RNA extraído foi sintetizado utilizando o kit SuperScript™ First-Strand para PCR em Tempo-Real (Invitrogen, USA) a partir de uma concentração de 2 µg do RNA total previamente extraído. O kit usado para fazer a síntese é composto por três tipos de primers (Oligo (dT), “Random hexamers” e GSP (“gene specific primer”)). Para este trabalho, foram escolhidos os “Random hexamers”, uma vez que estes permitem sintetizar cDNA a partir de todos os RNAs presentes em cada amostra, sem que estes tenham de ter obrigatoriamente uma cauda poli(A) intacta, o que não acontece por exemplo com os primers Oligo (dT). A reação é catalisada na presença de uma transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen, USA), que tem como finalidade converter o RNA em cDNA. Uma das grandes vantagens da transcriptase reversa utilizada é que esta não é inibida pela presença de RNA ribossomal e/ou de transferência. Para além disso, esta enzima também reduz a atividade da RNase H (que pode levar à degradação do mRNA). A RNase H é adicionada no último passo do protocolo para remover o RNA que, eventualmente, permanece na amostra, de forma a que reste apenas o cDNA que foi sintetizado.

Ao RNA usado para fazer a reação de PCR foram adicionados os primers “random hexamers”, os dNTPs e a água tratada com DEPC (para inativação de RNases), até se obter um volume final de 10µL. Segue-se a incubação de cada reação durante 5 minutos a 65°C (no termociclador), seguida de 1 minuto no gelo. De seguida, preparou-se uma “mastermix” com tampão RT, MgCl₂, DTT e RNase OUT Recombinante e adicionou-se a cada reação. Os tubos de reação foram colocados novamente no termociclador durante 2 minutos a 25°C. Após este tempo, foi adicionada a transcriptase reversa SuperScript II RT a cada tubo de reação e procedeu-se à incubação a 25°C durante 10 minutos, seguidos de 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 72°C. Terminado este tempo, adicionou-se a RNase H a cada tubo seguindo-se uma incubação a 37°C durante 20 minutos, para a destruição do RNA que serviu de “template” para a síntese de cDNA.

2.5. Quantificação da expressão genética - PCR em Tempo Real

O PCR (Polymerase Chain Reaction) Quantitativo em Tempo Real (qPCR) é o método standard mais sensível e preciso para quantificar a expressão de um gene (Lemma et al., 2016; Nascimento et al., 2015). Este método tem sido amplamente usado para caracterizar perfis de expressão de genes de interesse, uma vez que é rápido, sensível, específico, providencia simultaneamente medições de expressão genética em várias amostras diferentes, e pode ser aplicado em estudos, de investigação básica, médica, forense, etc (Bustin, 2008; Nygard et al., 2007; Stern-Straeter et al., 2009; Zhu et al., 2015). Neste estudo, a técnica de qPCR foi utilizada para detetar e analisar alterações na expressão genética dos genes supressores de tumor *RB*, *TP53*, *ATM*, *CDKN1A* e *GADD45A*, e dos oncogenes *SET* e *FGF2*. Os genes foram escolhidos com base nas suas funções celulares e na resposta à radiação, o que, baseado nos resultados dados pela literatura, os torna potenciais bons biomarcadores de exposição à radiação (Daino et al., 2006; Guleria and Chandna, 2016; Lourenço et al., 2016, 2013a, 2013b; Quintens et al., 2015; Rashi-Elkeles et al., 2011; Wiese et al., 2012; Wingert and Rieger, 2016).

Para garantir a uniformização dos procedimentos necessários para uma performance fiável do qPCR bem como a qualidade dos resultados obtidos, foram seguidas as diretrizes MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), que ajudam a assegurar a integridade da literatura científica, promovendo a consistência entre laboratórios e a transparência (Bustin et al., 2009). Assim, os seguintes parâmetros foram cumpridos de forma a garantir dados com a qualidade e precisão desejada, nomeadamente: a) foi isolado RNA de elevada qualidade, uma vez que qualquer degradação ou variabilidade introduzida pelo passo de extração pode causar problemas na reação de qPCR (Bustin, 2008; Walder et al., 2014); b) foi quantificado, de forma fiável, o RNA extraído, uma vez que deve de ser usado sempre a mesma quantidade de RNA de todas as amostras, para sintetizar cDNA (Bustin et al., 2009); c) utilizou-se uma boa enzima transcriptase reversa (RT) para a síntese de cDNA; d) os primers foram desenhados para serem eficientes e específicos na amplificação do cDNA; e) foi realizada uma normalização dos dados; f) foi calculada a eficiência da reação de qPCR (Walder et al., 2014); g) e adicionou-se controlos por forma a detetar contaminações na “mastermix” ou no próprio RNA (Bustin et al., 2009).

2.5.1. Desenho dos primers

O bom desenho de primers é um passo crucial em qualquer estudo de qPCR uma vez que aumenta a eficiência e especificidade da amplificação (Bustin, 2008; Li and Brownley, 2010). Assim sendo, existem algumas considerações importantes como: o tamanho do amplicão alvo (quanto menor for, melhor será a eficiência da reação), o conteúdo em GC (perto dos 50%), a especificidade dos primers, bem como a possibilidade de estes emparelharem em estruturas secundárias ou de formarem estruturas secundárias (Nolan et al., 2009). Se for escolhido um par de primers que não emparelha com a sequência alvo, ou que emparelha com partes da sequência que inibem algum passo da reação (como o caso das estruturas secundárias), a eficiência da reação vai ser afetada (Li and Brownley, 2010). Para tal, as sequências devem de ser analisadas com um software de “folding”, como o “m-fold” (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>, “The RNA Institute – College of Arts and Sciences – University at Albany”, USA) para DNA ou RNA, que faz a previsão da estrutura de um determinado gene à temperatura em que se vai dar o emparelhamento durante a reação, permitindo saber se os nossos primers têm ou não a probabilidade de emparelharem em estruturas secundárias da sequência do amplicão do gene que se pretende amplificar (Bustin et al., 2009; Nolan et al., 2009). Para amplificar os genes de estudo (*TP53*, *SET*, *ATM*, *RB*, *GADD45A*, *CDKN1A* e *FGF2*) e os genes de referência selecionados (*β -actina*, *YWHAZ*, *PGK1*, *HMBS* e *HPRT*) foram desenhados primers com base em sequências depositadas no GenBank (NCBI - Centro Nacional para Informação Biotecnológica, USA) para *Oryctolagus cuniculus* (ver tabela1). Pelo facto de o mesmo par de primers não se mostrar adequado, para o cálculo da eficiência da reação, em todas as condições e em todos os órgãos, foram desenhados três pares de primers para os genes *RB*, *ATM* e *FGF2*. Os primers usados para a análise da expressão genética de cada órgão estão listados na Tabela 2.

2.5.2. Avaliação da eficiência da reação

A avaliação da eficiência da reação de qPCR é um marco fundamental no procedimento de quantificação genética, uma vez que, uma eficiência de amplificação constante em todas as amostras é um importante critério para uma comparação fiável entre amostras em modelos de quantificação relativa (Pfaffl, 2004). A eficiência da amplificação deve ser determinada com base numa curva standard usando várias diluições do gene alvo, sendo que uma eficiência de 100% corresponde a um cenário perfeito da amplificação, onde há uma duplicação perfeita da quantidade de produto que

está a ser produzido na reação em cada ciclo, mas na prática o intervalo aceitável de eficiência encontra-se entre 90 a 110% (Nolan et al., 2009).

Tabela 1 - Sequências dos primers usados na análise de qPCR. Os primers foram desenhados usando o OligoPerfect™ (ThermoFisher Scientific), o “folding” foi analisado usando o “m-fold” para DNA e a complementaridade foi determinada usando o OligoCalc. Todos os primers amplificam fragmentos com cerca de 100 a 300 pares de bases e têm uma temperatura de “melting” de aproximadamente 60°C.

Nome do Gene e Referência da sequência no NCBI (USA)	Nome do primer	Sequência dos primers “Forward” (5' → 3')	Sequência dos primers Reversos (5' → 3')
Hydroxymethylbilane synthase - XM_002722723.3	HMBS	ACC AAG GAA CTG GAA CAT GC	TTG GGT GAA AGA CAA CAG CA
Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase - EF219063.1	HPRT	GAC CAG TCA ACA GGG GAC AT	ACA CTT CGA GGG GTC CTT TT
β-actin – NM_001101683.1	ACTB	AAG GAC CTG TAC GCC AAC AC	ACA TCT GCT GGA AGG TGG AG
Yrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta - XM_002710718.3	YWHAZ	TGC TGG TGA TGA CAA GAA GG	CCG ATG TCC ACA ATG TCA AG
Phosphoglycerate kinase 1 - XM_002720132.3	PGK1	GGC CGC TGT TCC AAG TAT TA	GCA CAG GCT TTC TCC ACT TC
RB transcriptional corepressor 1 - XM_002720723.3	RB1_1	CAT GCA GAG GCT GAA AAC AA	TCC GTA AGG GCG AAC TAG AA
	RB1_2	GAC CTC GAT GAG ATG CCA TT	CGA ACT GCT GGG TTG TGT TA
	RB1_3	TGC CAA CAC CAA CAA AAA TG	TTG GAC TCC CCT GGA ATA TG
ATM serine/threonine kinase - XM_008261832.2	ATM_1	AAG GCC GTA GAA GTT GCT GA	CCT CTT TGG CCC TTT TTA GG
	ATM_2	TCG GGA TCC AGA AAC AGT TC	GGC CGA TAC ATT TGG TTT TG
	ATM_3	GCA TTA CTG GCG TTG AAG GT	TTG CAT TCT TGG TCA TCT GC
Tumor protein p53 - NM_001082404.1	TP53	GCT CAA CGA AGA CCC AGA AG	GGA AGG GAC AGA GGA TGA CA
SET nuclear proto-oncogene - XM_008250993.2	SET	CCA TCC ACA AGT GTC TGC AC	ACG GGT CAC CAC TCT CAT TC
	FGF2_1	GAG AAG AGC GAC CCA CAC AT	GCC AGC AGT CTT CCA TCT TC
	FGF2_2	AGA AGA GCG ACC CAC ACA TC	GCC AGC AGT CTT CCA TCT TC
Fibroblast growth factor 2 - XM_002717238.3	FGF2_2	AGA AGA GCG ACC CAC ACA TC	GCC AGC AGT CTT CCA TCT TC
	FGF2_3	GGT TTC TTC CTG CGT ATC CA	GCC AGC AGT CTT CCA TCT TC
Growth arrest and DNA damage inducible alpha - XM_002715933.3	GADD45A	GAA GAC CGA AAG GAT GGA CA	TGG ATC AGG GTG AAG TGG AT
Cyclin dependent kinase inhibitor 1A - XM_002714669.3	CDKN1A	ACC TGC ACC CTG GTA CCT C	TAC GGC TTC CTC TTG GAG AA

Tabela 2 – Primers usados para aceder ao cálculo da eficiência da reação dos genes *RB*, *ATM* e *FGF2*, nos três órgãos analisados.

Órgão para análise	Tempo de recolha	Primers usados
Pulmão	Um mês de exposição	RB1_1; ATM_1; FGF2_1
	Três meses de exposição	RB1_2; ATM_2; FGF2_2
Fígado	Um mês de exposição	RB1_3; ATM_3; FGF2_3
Rim	Um mês de exposição	RB1_3; ATM_3; FGF2_3
	Três meses de exposição	RB1_3 (controlo) e RB1_1 (contaminado); ATM_3; FGF2_2

2.5.3. Determinação da expressão genética

A expressão genética dos genes de estudo nas duas condições (primeira recolha e colheita final) foi realizada com base numa análise de quantificação relativa. Este tipo de quantificação determina as alterações nos níveis de mRNA de um gene nas várias amostras e expressa-o em relação aos níveis de expressão de uma situação controlo e de um controlo interno (gene de referência) (Pfaffl, 2004).

O método usado, $\Delta\Delta Cq$, é um dos métodos mais populares de determinação de diferenças de expressão entre amostras e que tem como base a normalização com genes de referência e com uma situação controlo. Este método calcula a diferença de valores de Cq (ciclo de quantificação (ΔCq)) entre os genes alvo e os genes de referência, comparando-os entre si (Bustin et al., 2009), e mostrando se o gene em estudo está sobre-expresso ou sub-expresso, relativamente aos controlos internos e a uma condição controlo. A análise da expressão genética dos genes alvo, usados neste estudo, foi determinada com recurso ao software de análise de dados qbase^{Plus}/qPCR. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com recurso ao teste estatístico Unpaired t-student e a normalização dos dados obtidos foi realizado pelo software geNorm, que é um algoritmo que calcula a estabilidade de um determinado gene de referência com base no valor de M de cada gene de referência e no coeficiente de variação (CV). Um valor de M abaixo do 0,5 indica-nos que o gene é estável pois a variação entre réplicas técnicas de uma réplica biológica e entre réplicas biológicas não é significativa (Kozera and Rapacz, 2013; Stern-Straeter et al., 2009). Quanto ao valor de CV, quando este se encontra abaixo dos 25%, indica-nos que a variação entre réplicas biológicas e entre condição de controlo e de teste não é significativa e que os genes de referência estão estáveis (Bustin et al., 2009).

A sonda utilizada na reação de qPCR foi a SsoFast EvaGreen (Biorad, USA). Esta sonda foi escolhida porque tem um baixo potencial de inibição da reação e porque é ideal para protocolos de qPCR rápidos. Para além disso, satura completamente a sequência (intercalando-se entre todas as bases) tornando o sinal mais preciso. A reação de qPCR foi realizada num volume final de 20 μ L, contendo SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (BioRad, USA) concentrada 1x, cDNA diluído 1:10, primers a uma concentração de 500 nM e água destilada autoclavada para

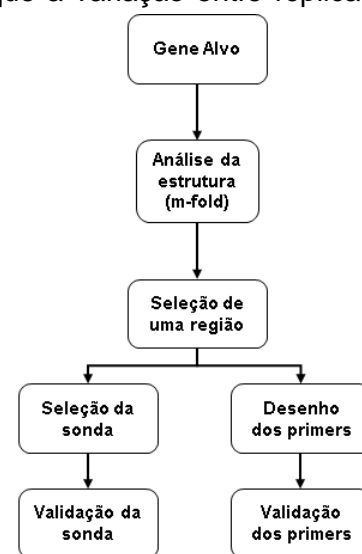


Figura 21 – Desenho experimental da análise por qPCR em Tempo-Real, adaptado de Nolan et. al, 2006.

prefazer o volume final. O equipamento usado foi o CFX96™ com o software CFX manager (BioRad, USA), num programa cíclico de: 30s a 98°C para desnaturação do DNA; 50 ciclos de 5s a 95°C e 10s a 57°C para “annealing” e extensão. A análise de qPCR incluiu três réplicas biológicas, cada uma com três réplicas técnicas, tendo sido adicionado à reação um controlo sem DNA (NTC – “Non Template Control”), para verificar possíveis contaminações na mastermix, bem como um controlo com o RNA extraído (NRT – “Non Reverse Transcriptase Control”) para detetar possíveis contaminações do RNA por DNA genómico, o que pode gerar falsos positivos ou falsear a quantificação da expressão. Cada reação incluiu a análise das curvas de “melting”, num intervalo de temperaturas de 65°C até 95°C (com leituras de 1,5°C em 1,5°C). As curvas foram realizadas para identificar uma possível presença de dímeros de primers e analisar a especificidade da reação.

2.5.3.1. Normalização dos resultados

A normalização dos dados, é uma componente essencial para validar um ensaio de qPCR, uma vez que minimiza os efeitos causados por variações no produto da extração, na transcrição reversa, na eficiência e na amplificação (Bustin et al., 2009). Esta normalização é feita por comparação com genes de referência, que devem ter uma expressão muito estável nos diferentes procedimentos experimentais e condições de teste, em todas as amostras (Lemma et al., 2016; Nascimento et al., 2015; Walder et al., 2014).

2.5.3.1.1. Genes de Referência

O termo gene de referência foi dado a genes que são necessários para a função celular e que são por isso continuamente expressos em todas as células (Stern-Straeter et al., 2009). No entanto, é crucial identificar quais são os mais estáveis para normalizar os dados obtidos a partir de uma análise de qPCR, tornando os resultados mais robustos e consistentes (Lemma et al., 2016). Toda esta normalização serve para despistar quaisquer possíveis resultados que possam levar a uma interpretação incorreta e menos precisa dos dados obtidos (Nascimento et al., 2015). Durante a seleção dos genes de referência, deve-se ter em conta algumas considerações, tais como: (1) a expressão destes genes tem de ser constante em diferentes condições experimentais; (2) a eficiência de amplificação destes genes deve de ser semelhante à dos genes de interesse; (3) e por fim, o nível de expressão destes genes deve ser semelhante à dos genes de interesse (Stern-Straeter et al., 2009).

Neste trabalho, foram selecionados 5 genes de referência que serviram como base de normalização dos dados obtidos por qPCR; o gene *HMBS*; o *HPRT1*; o *ACTB*; o *YWHAZ* e o gene *PGK1*. Os genes de referência *ACTB*, *YWHAZ* e *PGK1* foram utilizados para realizar a análise das amostras de pulmão e rim. No caso da análise das amostras de fígado foram usados, para o primeiro tempo de exposição, os genes *HMBS*, *HPRT* e *YWHAZ*. Quanto à análise do segundo tempo de exposição das amostras de fígado, foram testados, para além dos mencionados anteriormente, os genes: *RPL5* (Proteína Ribossomal L5); *ACTA* (Alfa Actina); *B₂M* (Microglobulina-2-Beta); *LDHA* (Lactate Dehidrogenase A); *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase); *TBP* (“TATA-box Binding Protein”); *TFRC* (Recetor de Transferrina); *CYC* (Ciclofilina C); *PPIA* (Peptidilprolil Isomerase A); *28S* (proteína ribossomal 28S); *EEF1A1* (Fator 1 Alfa 1 de Translocação e Elongação Eucariótico); *18S* (Proteína Ribossomal 18S); e *GUS* (Beta Glucuronidase). No entanto, nenhum dos genes de referência se mostrou adequado para proceder com a normalização dos dados no segundo tempo de exposição no fígado, ficando a análise por realizar. A seleção destes genes foi feita com base na bibliografia existente de trabalhos de exposição à radiação, e de trabalhos onde foi feita uma seleção ótima de genes de referência com base na sua estabilidade (Banda et al., 2007; Iyer et al., 2017; Lourenço et al., 2013a; Ponnaiya et al., 2013; Rodrigues et al., 2017).

2.5.3.1.1.1. Gene *HMBS* (Hidroximetilbileno Sintase)

O gene que codifica para a Hidroximetilbileno sintase está localizado no cromossoma 11, mais especificamente no segmento cromossomal q23.3, segundo dados do NCBI (Centro Nacional para Informação Biotecnológica - USA). A Hidroximetilbileno sintase é a terceira enzima (de um total de oito) da via biossintética de produção da molécula heme e está envolvida nas primeiras fases da biossíntese que combina quatro moléculas de porfobilinogénio para formar um composto designado de hidroximetilbilano (Lander et al., 1991; Ulbrichova et al., 2009; Yang et al., 2008). Uma mutação do gene *HMBS* resulta na condição patológica porfiria aguda intermitente (AIP), que se trata de um distúrbio autossómico na produção da molécula heme (Chen et al., 1994).

2.5.3.1.1.2. Gene *HPRT1* (Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferase)

O gene *HPRT1* codifica para a enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, que é uma enzima essencial para o metabolismo de purinas em células animais, uma vez que catalisa, no processo de reciclagem de purinas, a conversão de hipoxantina e guanina para os seus mononucleótidos respetivos, em mamíferos (Melton et al., 1984;

Yin et al., 2015). Uma deficiência parcial nesta enzima pode resultar numa sobreprodução de ácido úrico levando a uma forma severa de gota. A ausência desta enzima causa a síndrome de Lesch-Nyhan, que é caracterizado por uma hiperuricemia, atraso mental e auto-mutilação compulsiva (Melton et al., 1984; Sculley et al., 1992). De acordo com os dados disponibilizados na base de dados do NCBI (USA), o gene HPRT1 está localizado no cromossoma X na região q26.2-q26.3 e é composto por nove exões.

2.5.3.1.1.3. Actinas

As actinas são proteínas eucarióticas abundantes e altamente conservadas que existem em diferentes isoformas celulares (Dominguez and Holmes, 2011; Lassing et al., 2007). Estas características juntamente com a capacidade de transição entre os estados monomérico e filamentosos torna a actina bastante importante em algumas funções celulares como: motilidade celular, manutenção da forma e polaridade da célula e regulação da transcrição (Dominguez and Holmes, 2011). Os vertebrados expressam muitas isoformas de actinas, incluindo três isoformas alfa do músculo esquelético, cardíaco e liso e duas isoformas (beta e gama) que são expressas em células musculares e não musculares, sendo que uma das diferenças significantes entre estas isoformas é o número de resíduos de cisteína, seis para a beta e gama actina, e cinco para a alfa actina (Dominguez and Holmes, 2011; Lassing et al., 2007).

2.5.3.1.1.3.1. Gene *ACTB* (β -actina)

O gene *ACTB* codifica para a β -actina, que se trata de uma proteína não muscular abundante em muitos tipos celulares, que é essencial para a manutenção e mediação da matriz celular (Lassing et al., 2007). De acordo com a informação do NCBI (USA), o gene *ACTB* humano está localizado no cromossoma 7p22.1 e é constituído por 6 exões. Está reportado que mutações no gene *ACTB* podem estar associadas a casos de grandes difusões de células B em linfomas, uma vez que as actinas, nomeadamente a β -actina, estão envolvidas na ativação de linfócitos B (Lohr et al., 2012).

2.5.3.1.1.4. Gene *YWHAZ* (“yrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta”)

O gene *YWHAZ*, que codifica para uma proteína apoptótica, a 14-3-3 ζ (Li and Brownley, 2010; Neal et al., 2010), está localizado no cromossoma 8q22.3 e é composto por 11 exões, segundo a base de dados do NCBI (USA). As proteínas 14-3-3 estão

envolvidas em funções celulares importantes no desenvolvimento neurológico, tendo como função a síntese de dopamina e serotonina, entre outras (Jia et al., 2004; Neal et al., 2010). No entanto, estas proteínas também são cruciais para vários processos celulares tais como a sinalização, proliferação celular, regulação genética, divisão, adesão, migração, diferenciação e apoptose (Jia et al., 2004; Matta et al., 2012). Uma mutação neste gene tem sido relacionada com o desenvolvimento, progressão e metástase em alguns cancros, como o caso do cancro da mama e do pulmão (Matta et al., 2012).

2.5.3.1.1.5. Gene *PGK1* (Fosfoglicerase cinase 1)

O gene *PGK1* codifica para a fosfoglicerase cinase 1 (*PGK1*) que é uma enzima da via glicolítica regulada pelo fator 1α -indutor de hipóxia (Ahmad et al., 2013), catalisando um passo crucial da glicólise, que consiste na transferência de um grupo fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP formando ATP e 3-fosfoglicerato (Sun et al., 2015). Como se trata de uma enzima que gera ATP, a expressão de *PGK1* é sobre-regulada em vários tipos de cancro (Qian et al., 2017), estando envolvida na progressão e metástase de tumores (Ahmad et al., 2013), bem como na replicação e reparação do DNA (Sun et al., 2015). De acordo com a informação do NCBI, o gene *PGK1* localiza-se no cromossoma Xq21.1 e é composto por 11 exões.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Análise da concentração de radionuclídeos em amostras de água

Organismos e população humana vivendo nas imediações das minas de urânio estão expostos aos resíduos resultantes da extração do minério, quer por inalação de poeiras, ou por ingestão de água e alimentos contaminados por metais e radionuclídeos presentes nestes resíduos. A exposição da população humana e dos organismos a estes resíduos está associada a severos danos no organismo, sendo, por isso, necessária a realização de análises químicas e radiológicas aos vários compartimentos ambientais, por forma a avaliar o impacto destes resíduos nos organismos e no próprio ambiente.

Na tabela 3 encontram-se os resultados da análise da concentração de radionuclídeos presentes na água do poço que foi fornecida aos organismos teste. No local onde foi colocada a capoeira, os habitantes confirmaram que a água do poço é utilizada, maioritariamente, para irrigação de plantações e para consumo próprio (Neves et al., 2012b). Os resultados da análise revelaram que, no geral, as concentrações de cada radionuclídeo se encontram dentro dos parâmetros estipulados pelo governo português, (*Decreto Lei nº23/2016 de 3 de junho de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, 2016*), pela Organização Mundial de Saúde (OMS, do inglês “WHO”) (WHO, 2017) e pelo Ministério da Saúde do Canadá (Health Canada, 2009). O Decreto Lei nº23/2016 visa o controlo de substâncias radioativas na água destinada ao consumo da população portuguesa (*Decreto Lei nº23/2016 de 3 de junho de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, 2016*), no entanto, este decreto não possui critérios de controlo para os radionuclídeos ^{235}U , ^{230}Th e ^{232}Th . Assim sendo, para os radionuclídeos ^{239}Th e ^{232}Th foram utilizados, como termo de comparação, os critérios da OMS para o controlo da água para consumo (WHO, 2017). O capítulo nove (Aspetos Radiológicos) das Diretrizes para a qualidade da água para consumo, publicado em 2017 pela OMS, providencia critérios de segurança destas águas no que diz respeito ao seu conteúdo de radionuclídeos (WHO, 2017). Como nem o Decreto Lei nº23/2016 nem os critérios impostos pela OMS têm valores limite para o radionuclídeo ^{235}U , para comparação, foram utilizados, os valores de referência estipulados pelo Ministério da Saúde do Canadá. A publicação “Guidelines for Canadian drinking water quality”, realizada em maio de 2009, tem como objetivo avaliar os riscos de saúde humana associados à exposição a radionuclídeos e implementar valores de concentração máxima aceitáveis para a água para consumo humano (Health Canada, 2009). Atualmente, sabe-se que uma exposição a altas doses de radiação está ligada a efeitos severos no organismo (como o caso do cancro) e, apesar da existência de critérios de controlo radiológico que impõem limites calculados com base na causa-efeito, pouco se conhece à cerca dos possíveis efeitos,

para o ambiente e para a saúde humana e dos organismos que habitem nos arredores das minas de urânio, da exposição a baixas doses de radiação. Assim, o presente estudo, desenvolvido na mina de urânio da Cunha Baixa, pretende mostrar que, apesar dos valores de concentração de cada radionuclídeo estar dentro dos parâmetros, a exposição a estes contaminantes, provoca danos moleculares.

Trabalhos anteriores também analisaram a concentração dos radionuclídeos ^{238}U , ^{234}U , ^{235}U , ^{226}Ra , ^{230}Th , ^{232}Th , ^{210}Pb e ^{210}Po em amostras de água de vários poços na aldeia da Cunha Baixa (Carvalho et al., 2009a). Comparativamente, os resultados do presente estudo apresentaram valores de radionuclídeos semelhantes aos obtidos pelo estudo realizado por Carvalho e co-autores (Carvalho et al., 2009a). Para além deste estudo, Pereira e co-autores também analisaram as concentrações de radionuclídeos, mostrando que as águas e solos da mina da Cunha Baixa apresentavam concentrações elevadas de ^{226}Ra (Pereira et al., 2004). O ^{226}Ra é um radioisótopo particularmente preocupante uma vez que o seu tempo de meia-vida é de 1600 anos, o que resulta numa contínua formação e libertação de gás radão (^{222}Rn) a partir de resíduos contaminados por este elemento (Lourenço et al., 2016). A exposição prolongada a este gás torna-se, assim, um grande risco para os organismos vivos, uma vez que, este radioisótopo decai por emissão de radiação α , que é altamente ionizante e que causa graves danos moleculares, celulares e teciduais (IAEA, 2004).

Importa ainda referir que, estudos anteriores, realizados na mina da Cunha Baixa, mostraram que os solos e água desta zona estavam contaminados com elevados níveis de sulfatos, flúor, Ca e contaminados com metais, Fe, Mn, Al, S, Zn, Ni, Co, Be, Cu, Cd e U (Pereira et al., 2004; Pereira et al., 2008). Estes metais presentes no solo e água, da área mineira, podem ter sido remobilizados a partir do minério de forma natural, através da erosão mecânica e química do minério, ou de forma antropogénica, através de atividades mineiras ou através da deposição imprópria de resíduos (Lourenço et al., 2016; Pereira et al., 2004). Para além disso, Pereira e co-autores (Pereira et al., 2004) referem que a contaminação dos solos também resultava da utilização ilegal de água proveniente da estação de tratamento da mina e de nascentes com origem em escombrelas, para regadio. Assim, a contaminação do solo e da água resultou numa, conseqüente, contaminação dos lençóis freáticos na área mineira bem como na aldeia adjacente, com o mesmo nome. O estudo realizado por Carvalho e co-autores (Carvalho et al., 2009a), relacionou a contaminação dos lençóis freáticos com a diminuição do pH e com o aumento da concentração de iões de sulfato (também relatados por Pereira et al., 2004 e Pereira et al., 2008). No caso dos metais, Pereira e co-autores (Pereira et al.,

2008) observaram que os metais, como U e o Al, parecem ser os principais contaminantes das águas subterrâneas devido ao facto de serem os elementos mais móveis encontrados nesta área, e de se encontrarem em concentrações acima dos valores estipulados pelas “guidelines” de qualidade do solo (SQGV), estabelecidas para cada elemento. Os autores realçam ainda que estes elementos derivam, principalmente, de atividades de “heap leaching” do minério, bem como da deposição de lamas (Pereira et al., 2008), o que levou a que poços e terrenos de cultivo, a jusante da mina, fossem contaminados. Um problema sério da contaminação dos lençóis freáticos é o facto de os habitantes fazerem uso desta água para irrigação das suas plantações. Em três estudos realizados por Neves e co-autores (Neves et al., 2012a, 2012b, 2005) observou-se que, quando os vegetais eram irrigados com água contaminada, havia assimilação de metais, como o urânio, alumínio e manganês, pelas plantas o que pode promover uma transferência destes contaminantes pela cadeia alimentar. Para além dos estudos desenvolvidos por Neves e co-autores (Neves et al., 2012a, 2012b, 2005), um outro estudo realizado por Carvalho e co-autores (Carvalho et al., 2009b) na mina da Urgeiriça, também analisou uma possível transferência de radionuclídeos pela cadeia alimentar. Neste estudo, os autores analisaram produtos agrícolas observando que, quando irrigados com água da Ribeira da Patanha, havia um aumento da radioatividade, sendo o ^{226}Ra o isótopo mais concentrado nos vegetais. Os autores afirmaram ainda que, este isótopo pode ser o que mais contribui para o incremento da dose de radiação recebida pela população local (Carvalho et al., 2009b). Assim sendo, os consumidores, quando expostos, podem também assimilar estes contaminantes nos seus tecidos. Estudos anteriores mostraram uma bioacumulação de metais em *Apodemus sylvaticus*, principalmente no rim, fígado, ossos e pêlo (Lourenço et al., 2013a; Marcheselli et al., 2010). Estes estudos reforçam a conclusão dos estudos elaborados por Neves e co-autores (Neves et al., 2012a, 2012b, 2005). Por outro lado, um estudo também realizado por Lourenço e co-autores (Lourenço et al., 2012), mostrou que seres vivos decompositores, como *Eisenia andrei*, podem bioacumular metais e radionuclídeos e que também poderão, provavelmente, ter a capacidade de aumentar a biodisponibilidade dos metais, tornando-os acessíveis à assimilação pelas plantas.

A exposição dos organismos à radiação ionizante (IR), emitida pelos radionuclídeos, pode causar danos moleculares severos (Beer et al., 2014), por interação direta desta com a molécula de DNA ou indiretamente por formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (IAEA, 2004). Quanto aos metais, eles também têm um grande potencial para causar lesões através da formação de ROS, o que associado à capacidade de se ligarem

a proteínas envolvidas no combate ao stress oxidativo pode levar a danos no DNA e, conseqüentemente, à morte celular, mutagénese e carcinogénese (Ercal et al., 2001).

Tabela 1 – Concentração de radionuclídeos em solução presentes na água do poço usado para fornecer água aos organismos, com base em amostras recolhidas no dia 2 de outubro de 2013.

Designação	²³⁸ U	Stdev	VR ^{a)}	²³⁵ U	Stdev	VR ^{c)}	²³⁴ U	Stdev	VR ^{a)}	²³⁰ Th	Stdev	VR ^{b)}	²²⁶ Ra	Stdev	VR ^{a)}	²¹⁰ Pb	Stdev	²¹⁰ Po	Stdev	²³² Th	Stdev	VR ^{b)}	
Partículas (Bq/Kg)																							
Água do poço	14401	394	---	644	23	---	13816	379	---	1926	106	---	4378	296	---			6303	342	52,6	3,9	---	
Partículas (mBq/L)																							
Água do poço	285	8	3000	12,7	0,4	3000	273	7	2800	38,1	2,1	1000	86,5	5,8	500					1,04	0,08	1000	

VR^{a)}: Valor Referência de concentrações de radioatividade na água destinada com consumo humano em Portugal (*Decreto Lei nº23/2016 de 3 de junho de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, 2016*)

VR^{b)}: Valor Referência de concentrações de radioatividade na água destinada com consumo humano segundo a OMS (WHO, 2017).

VR^{c)}: Valor Referência de concentrações de radioatividade na água destinada com consumo humano no Canadá (Health Canada, 2009).

3.2. Análise da expressão genética das amostras de Pulmão, Rim e Fígado

O recurso a análises de expressão genética tem sido amplamente usado em vários estudos de exposição à radiação e a metais, sendo a técnica de qPCR em Tempo-Real a mais usada para este propósito. As análises foram realizadas em amostras de pulmão, fígado e rim em dois tempos de exposição diferentes (um mês e três meses de exposição). A análise das amostras de pulmão para o primeiro tempo de exposição não revelou diferenças estatísticas significativas. No entanto, é possível observar padrões de sobre-expressão nos genes *RB* ($p=0,185$), *GADD45A* ($p=0,223$) e *FGF2* ($p=0,230$), e um padrão de sub-expressão no gene *CDKN1A* ($p=0,137$). Para o segundo tempo de exposição, o resultado da análise mostrou resultados estatísticos significativos para os genes *ATM* ($p=0,037$), *GADD45A* ($p=0,027$) e *SET* ($p=0,012$). Apesar dos resultados estatísticos não serem significativos é possível observar um padrão de sobre-expressão no gene *TP53* ($p=0,058$), *FGF2* ($p=0,06$), *CDKN1A* ($p=0,329$). Quanto às amostras de rim, no primeiro tempo de exposição, os resultados obtidos revelaram uma sobre-expressão significativa em dois genes, o *RB* ($p=0,043$) e *FGF2* ($p=0,016$), no entanto, apesar de não significativo também se observa um padrão de sobre-expressão no gene *ATM* ($p=0,512$). Os restantes genes analisados apresentaram padrões de sub-expressão não significativos. No segundo tempo de exposição, os resultados mostraram, no geral, um padrão de sobre-expressão para todos os genes, mas apenas em três destes, *RB* ($p=0,005$), *FGF2* ($p=0,027$) e *SET* ($p=0,036$), se obtiveram resultados significativos. No caso das amostras de fígado no primeiro tempo de exposição, os resultados da análise mostraram significância em dois genes, o gene *RB* ($p=0,037$) e *CDKN1A* ($p=0,029$). Apesar de os restantes genes analisados não apresentarem resultados significativos, é possível observar padrões de sobre-expressão nos genes *GADD45A* ($p=0,08$), *FGF2* ($p=0,057$), *ATM* ($p=0,151$) e *TP53* ($p=0,513$). Não foi possível obter os resultados da análise das amostras de fígado, para o segundo tempo de exposição, uma vez que, durante esta análise surgiram alguns problemas com a estabilidade dos genes de referência, não tendo sido encontrados genes suficientemente estáveis para proceder com a análise por qPCR. Foram testados um total de treze genes de referência (*RPL5*, *ACTA*, *B₂M*, *LDHA*, *GAPDH*, *TBP*, *TFRC*, *CYC*, *PPIA*, *28S*, *18S*, *EEF1A1* e *GUS*) para além dos que foram utilizados nas análises das amostras de pulmão e rim (*YWHAZ*, *HMBS*, *HPRT*, *ACTB* e *PGK1*). No entanto, nenhum destes genes apresentou estabilidade na reação. Estes problemas podem estar relacionados, provavelmente, com a presença de contaminantes neste órgão que não puderam ser removidos de forma

eficaz durante o processo de extração (embora não tenha havido uma destabilização dos valores dos critérios de qualidade aplicados ao RNA extraído, ou seja, as razões 260/280 e 260/230 analisadas no Nanodrop) e que influenciaram de algum modo a síntese e amplificação do cDNA o que, conseqüentemente, levou à inibição da reação de qPCR. No presente estudo, a análise do gene *TP53* não revelou alterações significativas para nenhum dos tempos de exposição e para nenhum dos três órgãos analisados (pulmão primeira colheita: $p=0,881$; pulmão segunda colheita: $p=0,058$; fígado: $p=0,513$; rim primeira colheita: $p=0,246$; rim segunda colheita: $p=0,348$). Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 22, 23, 24, 25 e 26.

Pulmão – 1º Tempo de Exposição

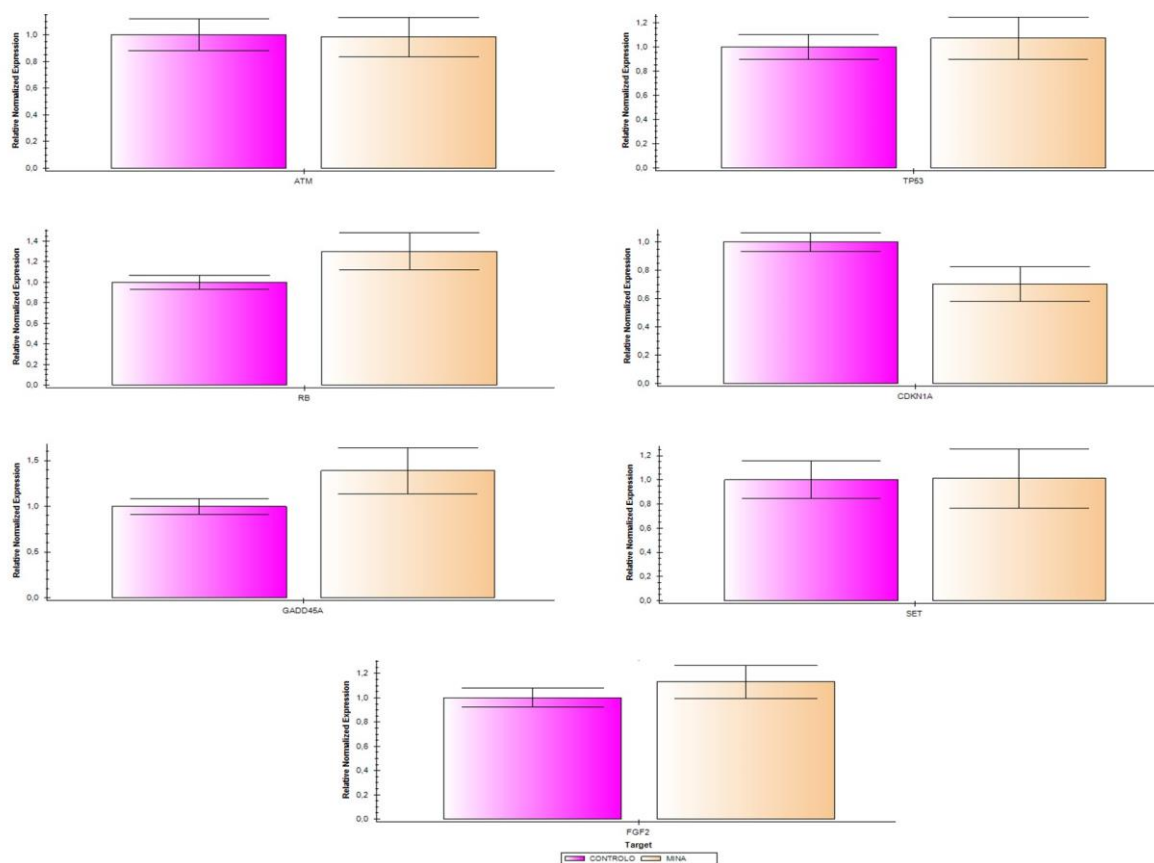


Figura 22 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de pulmão após um mês de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística não mostrou significância nos genes analisados ($p>0,05$).

Está descrito na bibliografia que o gene *TP53* é um bom biomarcador de resposta à radiação e à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pfeifer, 2010). Dois estudos recentes revelaram que a radiação ionizante (IR) é um ativador deste gene supressor de tumor e que este possui vários genes alvos (Monzen and Chiba, 2015;

Quintens et al., 2015). Um outro estudo realizado por Simone e co-autores (Simone II et al., 2013) revelou que a expressão do gene *TP53* foi induzida em LNCaP (do inglês, “androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells”) quando expostas a radioterapia. No mesmo ano, Lourenço e co-autores (Lourenço et al., 2013a) observaram que este gene se encontrava significativamente sobre-expresso, em amostras de fígado, após exposição a radionuclídeos e a metais. Os resultados obtidos no presente estudo não mostraram alterações significativas na expressão do gene *TP53* após exposição a metais e radionuclídeos, o que contraria os resultados obtidos pelos estudos acima mencionados. O gene *TP53*, que codifica para a proteína TP53, é um supressor de tumor “gatekeeper” que pode ser ativado por mutações, ou pela indução da ATM ou da PK-DNA e CHK2 (Stracker et al., 2013). Quando ativo, ele ativa mecanismos de reparação do ciclo celular por ativação de alvos a jusante, como é o caso do gene *GADD45A* e do gene *CDKN1A*, promovendo a morte por apoptose quando o dano não poder ser reparado (Salvador et al., 2013; Vogelstein et al., 2000).

A análise da expressão genética do gene *ATM* nas amostras de pulmão revelou diferenças significativas ($p=0,037$) após três meses de exposição a metais e radionuclídeos (Figura 23). O gene *ATM* é um gene supressor de tumor “caretaker” que está envolvido na proteção do genoma contra danos e mutações, respondendo principalmente a quebras de cadeia dupla do DNA (DSBs) (Kubota et al., 2014). A ativação da proteína ATM leva à fosforilação de proteínas envolvidas no controlo dos “checkpoints” do ciclo celular, como é o caso da proteína TP53. A ativação desta proteína leva, por sua vez, à indução da expressão de alguns genes alvo, como o caso dos genes *CDKN1A* e *GADD45A*, promovendo, assim, a paragem do ciclo celular (Ryan et al., 2001; Salvador et al., 2013; Stracker et al., 2013). A sobre-expressão do gene *ATM* no presente estudo é indicativo de uma resposta a danos no DNA (DDR, do inglês “DNA Damage Response”), bem como de uma resposta das células do pulmão no sentido de promover a manutenção da sua estabilidade genómica. Para além disso, estes resultados sugerem que a exposição de organismos vivos aos resíduos da exploração do urânio tem um grande potencial para causar sérios danos no DNA. Os resultados do presente estudo para o gene *ATM* estão em concordância com um estudo desenvolvido por Storozhuk e co-autores (Storozhuk et al., 2013), em que os autores mostraram que o gene *ATM* está relacionado com DDR em cancro do pulmão. Por outro lado, por forma a entender o que sucede em caso de sub-expressão, um estudo realizado por Roy e co-autores (Roy et al., 2006), associaram baixos níveis de ATM a um aumento da sensibilidade das células à IR. Isto deve-se ao facto de o padrão de sub-expressão estar relacionado com uma

ineficiente reparação dos danos no DNA, podendo levar ao aparecimento de cancro. Os resultados obtidos, no presente estudo, para este supressor de tumor revelam que este poderá ser um potencial biomarcador de exposição a metais e radionuclídeos, em amostras de pulmão, após três meses de exposição.

Pulmão – 2ª Tempo de Exposição

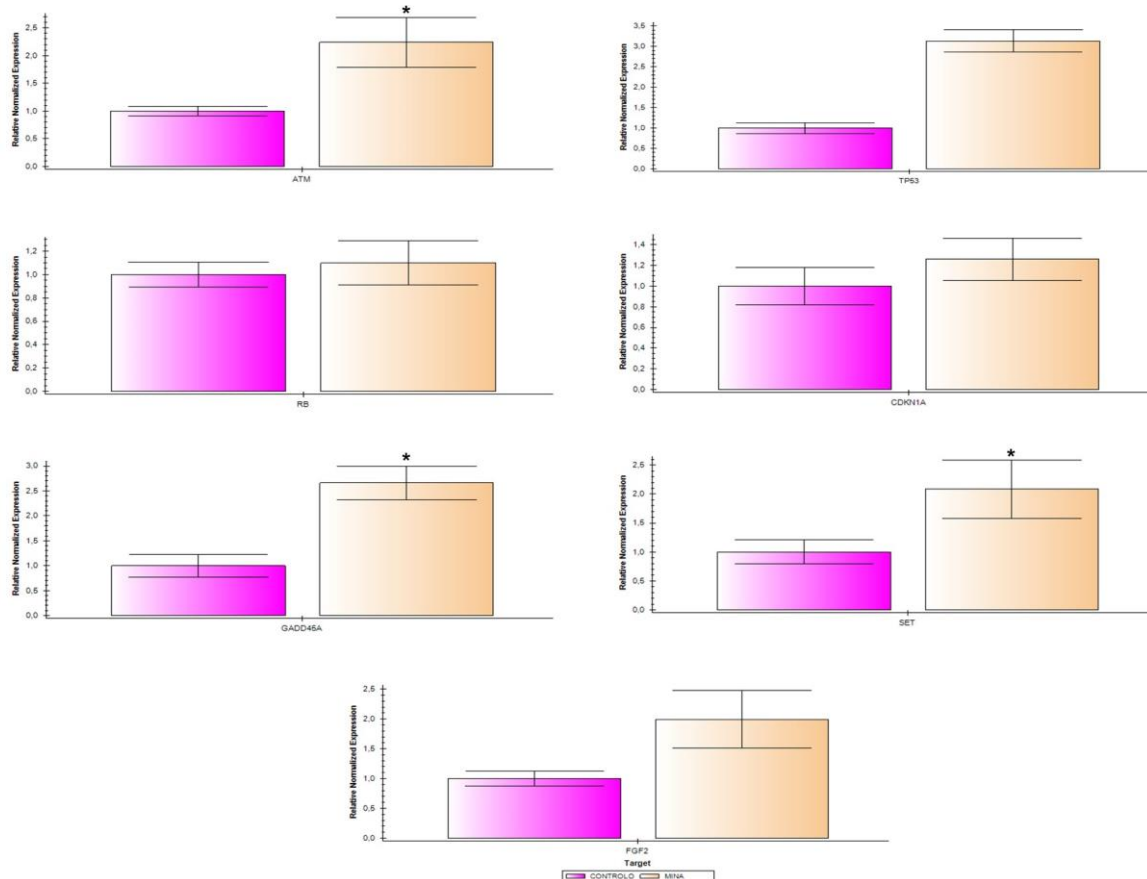


Figura 23 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de pulmão após três meses de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em três genes analisados ($p < 0,05$).

No presente estudo é possível observar uma sobre-expressão significativa do oncogene *SET* (Figura 23 e 26), em amostras de pulmão ($p=0,012$) assim como de rim ($p= 0,036$), após três meses de exposição. O gene *SET* é um oncogene envolvido na promoção da tumorigénese em várias neoplasias, como é o caso da CML (Leucemia Mieloide Crónica, do inglês “Chronic Myelogenous Leukemia”) e da AML (Leucemia Mieloide Aguda, do inglês “Acute Myeloid Leukemia”) (Cristóbal et al., 2012; Oaks and Ogretmen, 2015; Switzer et al., 2011). Um estudo recente mostrou que a sobre-expressão do gene *SET* estava associada a uma diminuição significativa dos efeitos pró-apoptóticos de um medicamento quimioterapêutico, levando a uma diminuição da

sensibilidade das células pulmonares cancerígenas a este tipo de medicamentos. Os autores concluíram que este gene estava envolvido na carcinogênese e desenvolvimento de quimiorresistência em células pulmonares cancerígenas (Hung et al., 2015). Tendo em consideração os resultados do estudo de Hung e co-autores (Hung et al., 2015) e os resultados do presente estudo, é possível sugerir que, provavelmente, este gene poderá conferir radioresistência à radiação ionizante (IR). Um outro estudo, desenvolvido anteriormente, também mostrou o mesmo padrão de expressão genética para este oncogene após exposição a doses baixas de radiação e metais, mas num organismo (minhoca) com um nível de complexidade diferente do utilizado neste estudo (coelho) (Lourenço et al., 2013b). Assim, embora o organismo utilizado no presente estudo pertença a um grupo distinto do utilizado no estudo de Lourenço e co-autores (Lourenço et al., 2013b), os resultados sugerem que este gene é um bom biomarcador de exposição a estes contaminantes em organismos com diferentes níveis de complexidade, mesmo que não seja comumente usado neste tipo de estudos. A oncoproteína SET exerce a sua função através da inibição de uma proteína supressora de tumor, a PP2A, impedindo que esta exerça as suas funções celulares. SET inibe a PP2A por ligação direta ao seu domínio catalítico promovendo assim, a progressão de células tumorais (Oaks and Ogretmen, 2015). A PP2A regula uma grande variedade de vias de sinalização, e a perda das suas funções tem sido associada com a transformação celular (Cristóbal et al., 2012). Já foi anteriormente demonstrado que, uma das funções da proteína supressora de tumor PP2A é regular a fosforilação da proteína ATM em células não danificadas. Isto acontece porque a PP2A liga-se fisicamente à ATM e regula a fosforilação na Ser1981 (Aglipay et al., 2006). Quando as células normais são expostas à radiação ionizante há indução da fosforilação dependente da dissociação da PP2A da ATM, mesmo a baixas doses de radiação (Aglipay et al., 2006; Goodarzi et al., 2004). Assim, para que a ATM fosforile e se torne ativa, exercendo as suas funções na presença de DSBs, é necessário que esta ligação física entre a PP2A e a ATM se desfaça (Goodarzi et al., 2004). No estudo desenvolvido por Goodarzi e co-autores (Goodarzi et al., 2004), os autores mostram que o ácido ocadaico, um inibidor da PP2A, promovia a dissociação do complexo PP2A/ATM sem causar dano na célula, promovendo assim a fosforilação da proteína ATM. Seguindo este raciocínio, sendo o oncogene SET também um inibidor da proteína PP2A, é possível sugerir que, provavelmente, após a exposição à IR, este inibidor também possa contribuir para alterações na expressão do supressor de tumor ATM, em pulmão, uma vez que poderá estar a inibir as funções da proteína supressora de tumor PP2A.

Fígado – 1º Tempo de Exposição

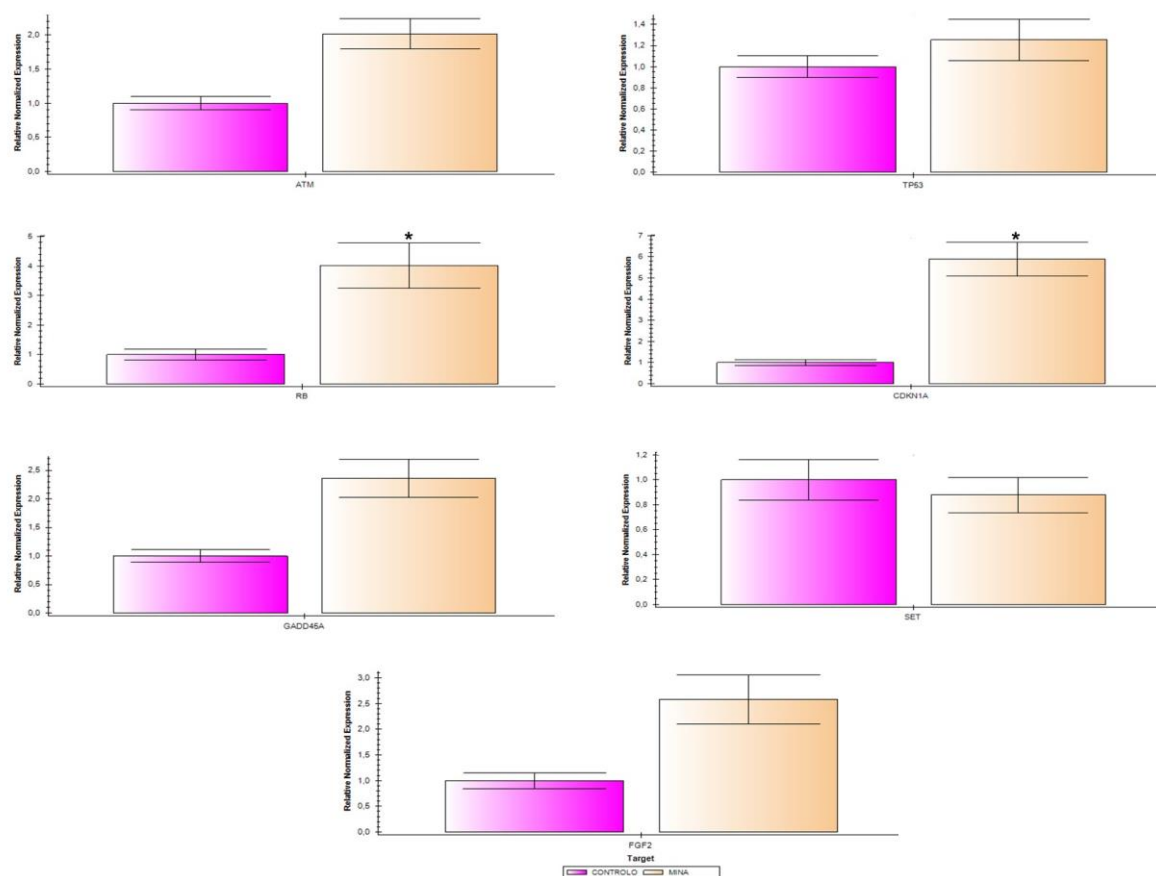


Figura 24 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de fígado após um mês de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em dois genes analisados ($p < 0,05$).

Também foram observadas diferenças significativas no gene *GADD45A* ($p=0,027$) após três meses de exposição a metais e radionuclídeos em amostras de pulmão (Figura 23). A sobre expressão do supressor de tumor *GADD45A* também é relatada noutros estudos anteriores de exposição à IR e a radioterapia (Daino et al., 2006; Mathew et al., 2015; Sokolov and Neumann, 2014). O gene *GADD45A* é um gene supressor de tumor “gatekeeper” que está envolvido em processos como a progressão e paragem do ciclo celular, sobrevivência e morte celular e reparação do DNA (Wingert and Rieger, 2016). Trata-se de um gene que se encontra sob controlo transcricional pela proteína TP53 (Salvador et al., 2013) tal como o gene *CDKN1A*. Apesar de se tratar de um supressor de tumor, alguns estudos relatam que este gene tem, também, um papel importante como oncogene (Tamura et al., 2012; Tront et al., 2010). No estudo realizado por Tront e co-autores (Tront et al., 2010), os autores mostram o papel paradoxal do gene *GADD45A*. Aqui, os autores mostram que o gene *GADD45A* pode exercer o seu papel de supressor

de tumor, através da ativação de vias que levam à apoptose, como também pode promover o aumento da vascularização e crescimento tumoral no cancro da mama, através da regulação negativa da expressão da MMP10 (uma metalopeptidase 10 da matriz) via cascata de sinalização GSK3 β / β -catenina (Tront et al., 2010). Um outro estudo mostrou também este papel oncogénico do gene *GADD45A* em NSCLC (do inglês, “non-small cell lung cancer”), fazendo a análise da expressão genética do gene, e também, a associação deste gene com efeitos histológicos, sugerindo que o gene *GADD45A* tem um papel importante na diferenciação de cancro no pulmão (Higashi et al., 2006).

No presente estudo, o gene supressor de tumor *CDKN1A* aparece significativamente expresso em amostras de fígado após um mês de exposição ($p=0,029$) (Figura 24). Estes resultados apontam este gene como um bom biomarcador de exposição à IR e a metais, uma vez que se apresentou significativamente sobre-expresso após apenas um mês de exposição a estes contaminantes. *CDKN1A*, que codifica para a proteína p21, é um gene supressor de tumor “gatekeeper” envolvido na regulação de alguns processos como o caso da progressão do ciclo celular e apoptose (Wiese et al., 2012). Este gene promove a paragem do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M em resposta a danos no DNA (Vogelstein et al., 2000). No caso da apoptose, este gene tem a capacidade tanto de induzir como prevenir a apoptose, mostrando que o seu papel pode ser paradoxal. Ao assumir o papel de oncogene, este inativa o processo de apoptose, possibilitando a persistência de danos no DNA o que pode levar à formação de células tumorais. A propriedade anti-apoptótica da proteína p21 reside na sua capacidade de inibir a atividade de proteínas envolvidas na indução da apoptose (ex. caspases) e de controlar a transcrição não só de genes com atividades anti-apoptóticas, tornando-os sobre-regulados, mas também de genes pró-apoptóticos, resultando na sua sub-regulação (Mirzayans and Murray, 2016). Num recente estudo, realizado por Price e co-autores (Price et al., 2015), os autores observaram esta paradoxalidade do gene *CDKN1A*. Aqui, os autores observaram que este gene estava significativamente induzido em células “Langerhans” (LCs) e que a proteína p21 pode contribuir para a habilidade das LCs resistirem à IR através da prevenção da apoptose. Para além disso, os autores verificaram, ainda, que para além de este gene se mostrar como um regulador crítico na inibição dos mecanismos apoptóticos, é também um regulador da própria apoptose, promovendo-a em caso de dano (Price et al., 2015). Um outro estudo realizado por Amundson e co-autores (Amundson et al., 2001), mostrou que a exposição a baixas doses de radiação resultou numa sobre-expressão do gene *CDKN1A*, bem como do gene

GADD45A, o que levou a um atraso nas transições entre as diferentes fases do ciclo celular.

Os resultados obtidos, no presente estudo, são interessantes, uma vez que o gene *TP53* não apareceu significativamente expresso em nenhum dos três órgãos analisados para nenhuma das condições experimentais, e, como referido anteriormente, tanto o gene *CDKN1A* como o gene *GADD45A* são controlados transcricionalmente pela proteína TP53 (Salvador et al., 2013; Vogelstein et al., 2000). Isto permite sugerir três possíveis causas para o perfil de expressão destes genes: 1) como o gene *TP53*, não se encontra significativamente expresso e como os genes *GADD45A* e *CDKN1A* são controlados transcricionalmente pela TP53 (proteína codificada pelo gene *TP53*), provavelmente, estes genes poderão estar a exercer o seu papel de oncogene; ou 2) a exposição a radionuclídeos e metais está a induzir alterações diretas nestes genes; ou 3) uma vez que os resultados mostram uma sobre-expressão do gene *TP53*, embora não significativa, provavelmente, poderá estar a ocorrer indução da transcrição dos genes *GADD45A* e *CDKN1A* pela proteína TP53, exercendo as suas funções de supressores de tumores.

Ainda no presente estudo, o gene *RB* encontra-se, significativamente expresso no rim e fígado após um mês ($p=0,043$ e $p=0,037$, respetivamente) e no rim ao fim de três meses ($p=0,005$), de exposição a metais e radionuclídeos (Figuras 24, 25 e 26). Tal como referido anteriormente, não foi possível analisar as amostras do fígado correspondentes ao segundo tempo de exposição. O gene *RB* é um gene supressor de tumor “gatekeeper” que está bem documentado em estudos de exposição à radiação. Alguns estudos referem que a perda da função deste gene está associada a uma ineficiente reparação de danos no DNA e apoptose (Thangavel et al., 2014). Para além disso, o gene *RB* está envolvido no controlo dos eventos do ciclo celular, expansão clonal, paragem do ciclo celular, manutenção do estado pós-mitótico, bem como resposta a danos no DNA, apoptose, diferenciação, quiescência e senescência (Genovese et al., 2006; Narasimha et al., 2014). Trata-se de um gene cuja expressão pode ser induzida pela ação das proteínas TP53 e p21 (Cazzalini et al., 2010; Conkrite et al., 2012; Thangavel et al., 2014). Para além disso, um estudo realizado por Thangavel e co-autores (Thangavel et al., 2014) mostrou que, a radiação tem grande potencial para causar alterações diretas na expressão deste gene (Thangavel et al., 2014).

Rim – 1º Tempo de Exposição

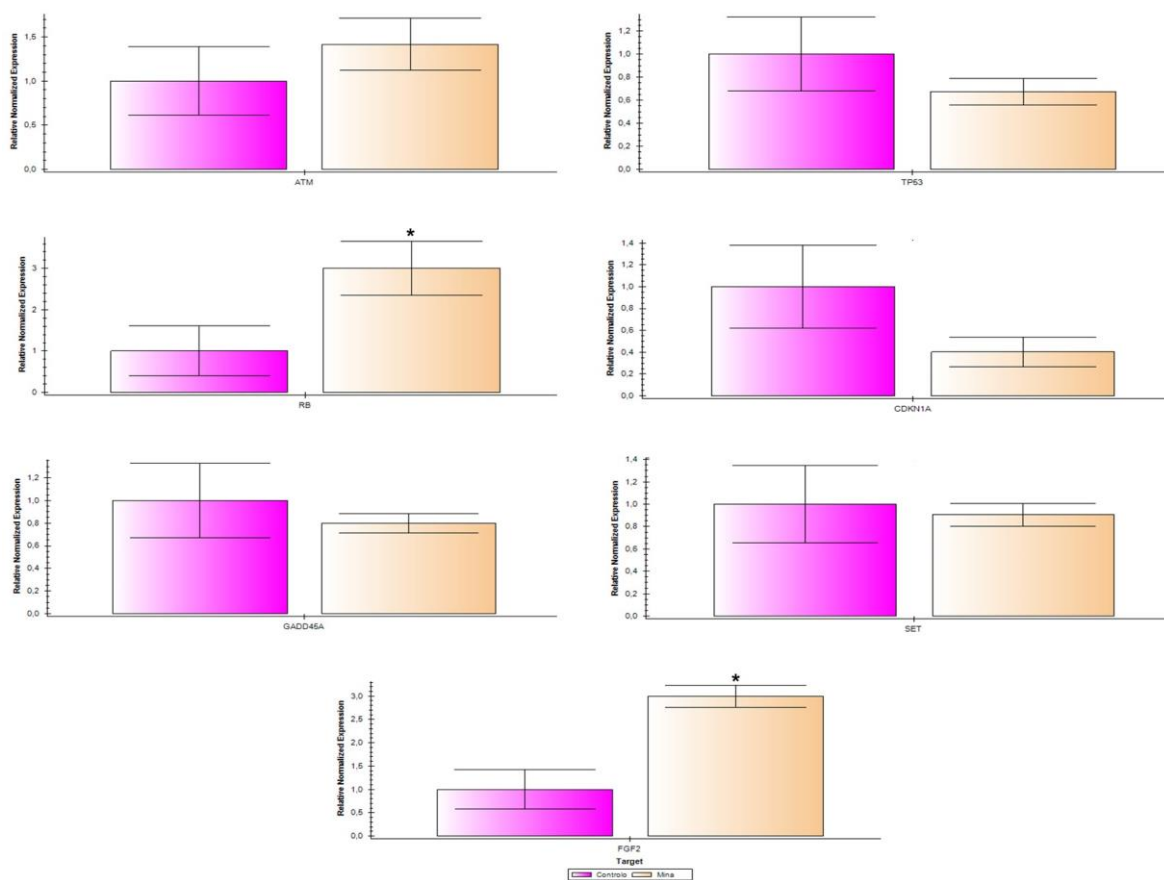


Figura 25 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de rim após um mês de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em dois genes analisados ($p < 0,05$).

Os resultados do presente estudo para as amostras de fígado (Figura 24) mostram que a proteína p21 ou a ação direta da radiação poderão estar por de trás da indução da expressão do gene *RB*, uma vez que este gene se encontra significativamente sobre-expresso nestas amostras após um mês de exposição a metais e radionuclídeos. Quanto às amostras de rim do primeiro tempo (Figura 25) de exposição, os resultados mostram que a exposição aos contaminantes poderá, provavelmente, estar a induzir alterações diretas na expressão do gene *RB*. Por outro lado, após três meses de exposição (Figura 26) a estes contaminantes, apesar da expressão não ser significativa, está a haver sobre-expressão do gene *TP53*, o que também, provavelmente, poderá estar a induzir a expressão do gene *RB*.

Rim – 2º Tempo de Exposição

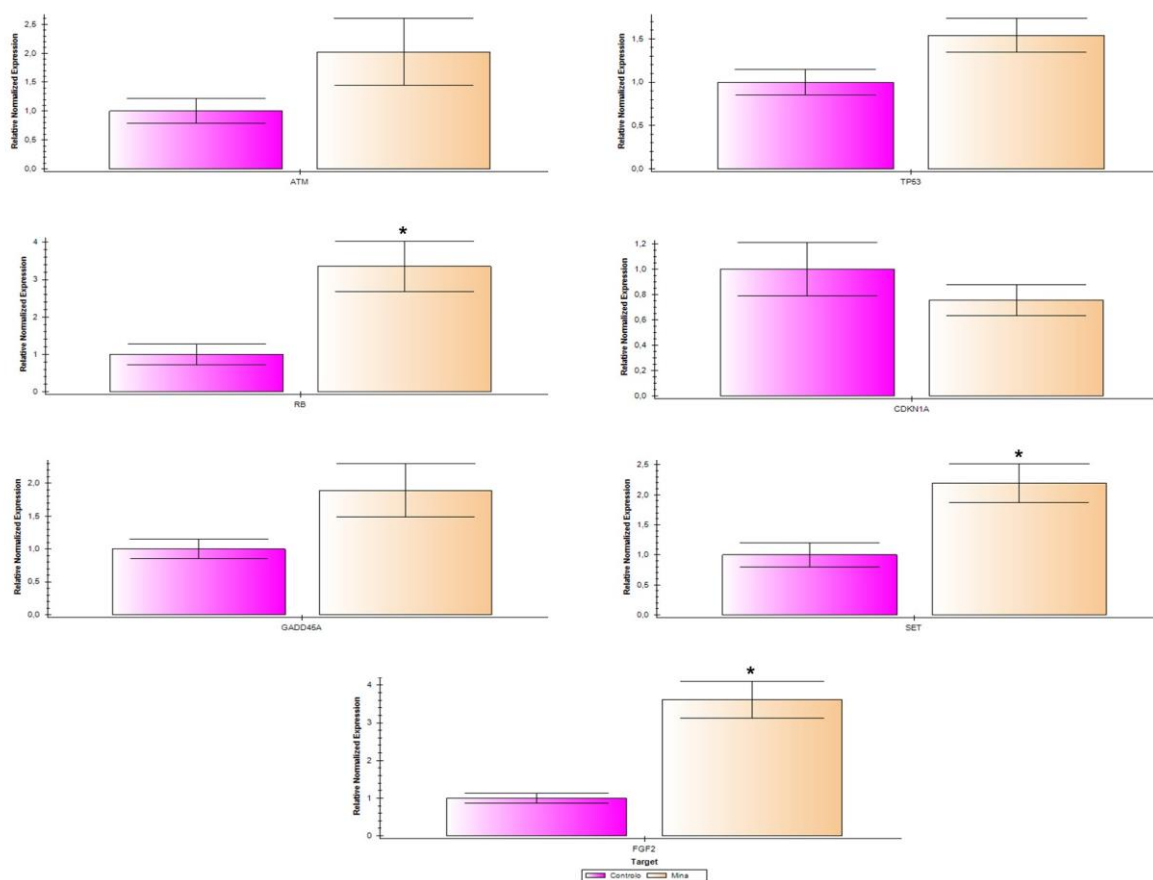


Figura 26 - Resultado da análise da expressão genética das amostras de rim após três meses de exposição a metais e radionuclídeos. A análise estatística mostrou significância em três genes analisados ($p < 0,05$).

No que se refere ao oncogene *FGF2*, este apresenta-se significativamente sobre-expresso em amostras de rim após um mês ($p=0,016$) e três meses ($p=0,027$) de exposição, apontando este gene como um provável bom biomarcador de exposição, uma vez que, nos permite inferir se estão a ser ativadas vias de progressão tumoral num relativo curto espaço de tempo. Neste caso, embora não exista um número considerável de estudos de expressão genética de exposição à radiação que usem este gene como biomarcador, Amundson e co-autores (Amundson et al., 2001), fizeram referência à indução da expressão do gene *FGF2* em células ML-1 (linhagem celular de células mieloides cancerígenas) quando expostas a baixas doses de radiação, *in vivo*. Tal como os resultados obtidos no presente estudo, o estudo desenvolvido por Harfouche e co-autores (Harfouche et al., 2010), revelou que quando células estaminais foram expostas à IR, o oncogene *FGF2* apresentou-se sobre-expresso. Num outro estudo desenvolvido por Korah e co-autores (Korah et al., 2004), os autores mostraram que o desenvolvimento de

um fenótipo maligno estava associado ao fator FGF2 e aos seus efeitos na redução da motilidade e na invasão celular. O gene FGF2 é um gene que codifica para um fator de crescimento fibroblástico responsável por estimular o crescimento de vários tipos celulares (Ono et al., 2012; Shah et al., 2012). Assim sendo, este fator, para além de estar envolvido no crescimento, e progressão, de células normais também está envolvido no crescimento de células tumorais (Ono et al., 2012). A função oncogénica deste gene é documentada nos estudos referidos anteriormente (Amundson et al., 2001; Harfouche et al., 2010; Korah et al., 2004). Por outro lado, como este fator também está envolvido no desenvolvimento de células normais, em certas circunstâncias a sobre-expressão do gene *FGF2* pode estar associado à inibição do crescimento tumoral. Um estudo realizado por Linderholm e co-autores, em 2003, mostrou que a sobre-expressão de bFGFs (no qual se inclui o gene FGF2) estava ligado a bons indicadores prognósticos em cancro da mama, tais como: tamanho pequeno do tumor; ausência de nódulos linfáticos axilares metastisados e baixa taxa de proliferação (Linderholm et al., 2003),

Numa análise global dos dados obtidos pela análise por qPCR em Tempo-Real, é possível verificar que: (1) observaram-se resultados significativos logo após um mês de exposição a metais e radionuclídeos nos órgãos fígado e rim; (2) tendo em consideração que tanto o fígado como rim são órgãos onde há uma maior bioacumulação de urânio e rádio, os resultados do presente estudo, confirmam a sensibilidade destes órgãos a metais e radionuclídeos; (3) os genes *RB*, *CDKN1A* e *FGF2*, revelaram-se bons biomarcadores de exposição à IR e a metais, porque é possível observar alterações significativas de expressão imediatamente após um mês de exposição; (3) tanto a radiação emitida pelos radionuclídeos, que compõem a cadeia de decaimento do urânio, como os metais têm grande potencial para causar danos no DNA.

Assim, é possível concluir que, de acordo com a concentração dos radionuclídeos presentes na água e com os dados obtidos pela a análise da expressão genética de biomarcadores de exposição à radiação, a mina da Cunha Baixa apresenta-se como um potencial risco para a população e organismos residentes nos seus arredores.

Capítulo 4 – Conclusão

O presente estudo mostra que a exposição a alimentos e água contaminados com metais e radionuclídeos tem sérios efeitos genotóxicos nos organismos testados. Apesar de a análise à água do poço não ter revelado níveis acima dos estipulados pelo governo português, pela OMS e pelo ministério da saúde do Canadá (*Decreto Lei nº23/2016 de 3 de junho de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, 2016; Health Canada, 2009; WHO, 2017*), as concentrações presentes parecem ter um efeito negativo, tal como mostram os resultados da expressão genética dos tecidos analisados. É possível concluir que a exposição a estes contaminantes está a ativar respostas a danos no DNA (DDR), bem como respostas que conduzem à progressão tumoral, uma vez que foi detetada a sobre-expressão de genes supressores de tumor, nomeadamente dos genes *ATM*, *RB*, *GADD45A* e *CDKN1A*, e dos oncogenes, *SET* e *FGF2*. Considerando que a sobre-expressão do gene *ATM* está associada à ocorrência de danos de cadeia dupla do DNA (DSBs), os resultados obtidos para este gene reforçam a ideia da ocorrência de DSBs, que é o tipo de dano mais comum provocado pela radiação ionizante (IR), e da DDR. Os genes supressores de tumor acima referidos, são cruciais para a defesa do organismo contra a formação do tumor e tem sido descrita a indução da sua expressão em células com danos no DNA. No que se refere aos oncogenes, alterações significativas na sua expressão podem ser relacionadas com eventos como, por exemplo, a proliferação de células tumorais. No geral, à exceção dos genes *TP53* e *RB*, os resultados obtidos para os restantes genes analisados vão de encontro com os resultados de estudos desenvolvidos anteriormente de exposição à IR. No caso do gene *TP53* os resultados do presente estudo não mostraram significância estatística, o que não tem sido relatado em estudos anteriores de exposição a baixas e altas doses de IR. Quanto ao gene *RB*, estudos de exposição a altas doses de radiação ionizante mostram alterações significativas na expressão deste gene. No presente estudo, a exposição a baixas doses de radiação mostrou também uma alteração significativa na expressão deste gene, o que permite concluir que a baixas doses de IR também ocorrem alterações significativas na expressão deste gene.

Em suma, os resultados aqui apresentados permitem ainda concluir que: (1) o organismo modelo usado é um bom bioindicador de exposição à radiação em estudos *in situ*; (2) um mês de exposição é um intervalo de tempo suficiente para induzir alterações significativas na expressão genética destes genes nos órgãos estudados (fígado e rim); (3) a exposição a metais e radionuclídeos, associado ao consumo de água e alimentos contaminados, provoca alterações genéticas significativas que poderão aumentar o risco de desenvolvimento de cancro; (4) a mina da Cunha Baixa apresenta um risco para

população residente nos arredores bem como para os organismos que habitam a área da mina.

Capítulo 5 – Perspetivas Futuras

Apesar de todas as conclusões retiradas sobre este estudo, muitas questões ficam ainda por responder e esclarecer sobre os efeitos da exposição a estes contaminantes. Tendo em conta que a procura por energia nuclear é grande, atualmente encontram-se, no mundo, 447 reatores operáveis e 56 em construção, sendo os Estados Unidos da América e a França os países que mais produzem este tipo de energia. Desta forma, para fornecer os atuais reatores ainda são realizadas atividades de extração de urânio por todo mundo. Para além disso, países como a China e a Índia fizeram um grande investimento na construção de novos reatores nucleares para obtenção de mais energia nuclear. A procura por energia nuclear, por parte destes países, incide principalmente no custo da energia e na baixa emissão de CO₂. Posto isto, há um aumento da necessidade de extração de urânio, no futuro, por forma a fornecer os reatores em construção e, portanto, é necessário um conhecimento claro e preciso sobre os efeitos que esta atividade pode causar à população humana e ao próprio ambiente, de forma a que possam ser tomadas medidas que minimizem o risco de exposição à radiação. Para além disso, ainda existem minas de urânio desativadas, perto de aldeias povoadas, que ainda não foram remediadas, apresentando-se como um potencial risco para a saúde pública. Assim sendo, seria necessário que investigações futuras se focassem em:

- Eventos pós-transcricionais, por forma a perceber se esta indução da alteração genética está efetivamente a dar origem a mutações e ao desenvolvimento de cancro;
- Entender as vias de sinalização que estão a ser ativadas pela exposição à radiação e a metais, por forma a compreender melhor o papel de cada gene na resposta a danos no DNA;
- Perceber se a proteína codificada é funcional e que papel esta a exercer na célula, permitindo esclarecer sobre possíveis danos nas funções celulares básicas;
- Mostrar as respostas que podem ocorrer nos diferentes órgãos que compõem um organismo, contribuindo assim, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade destes contaminantes;
- Perceber se a toxicidade destes contaminantes tem o potencial para causar distúrbios no sistema imunitário, consequentemente diminuindo a eficiência da resposta imunológica;
- Estabelecer um paralelismo entre os dados obtidos em mamíferos e os possíveis efeitos em humanos, de forma a conseguir prever o risco da exposição da população humana a este tipo de contaminantes.

- Abbas, T., Dutta, A., 2010. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities Tarek. *Nat Rev Cancer* 9, 400–414. doi:10.1038/nrc2657.p21
- Aglipay, J.A., Martin, S.A., Tawara, H., Lee, S.W., Ouchi, T., 2006. ATM activation by ionizing radiation requires BRCA1-associated BAAT1. *J. Biol. Chem.* 281, 9710–9718. doi:10.1074/jbc.M510332200
- Ahmad, S.S., Glatzle, J., Bajaeifer, K., Bühler, S., Lehmann, T., Königsrainer, I., Vollmer, J., Sipos, B., Ahmad, S.S., Northoff, H., Königsrainer, A., Zieker, D., 2013. Phosphoglycerate kinase 1 as a promoter of metastasis in colon cancer. *Int. J. Oncol.* 43, 586–590. doi:10.3892/ijo.2013.1971
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Gold, L.S., 1993. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 101, 35.
- Amundson, S. a, Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Fornace, a J., 2001. Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 156, 657–661. doi:10.1667/0033-7587(2001)156[0657:IOGEAA]2.0.CO;2
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 620–631. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.02.007
- Arzuaga, X., Rieth, S.H., Bathija, A., Cooper, G.S., 2010. Renal effects of exposure to natural and depleted uranium: A review of the epidemiologic and experimental data. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* 13, 527–545. doi:10.1080/10937404.2010.509015
- Asaithamby, A., Chen, D., 2012. Mechanism of Cluster DNA Damage Repair in Response to High- Atomic Number and Energy Particles Radiation. *Mutat Res.* 711, 87–99. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.11.002.Mechanism
- Aten, J.A., Stap, J., Krawczyk, P.M., van Oven, C.H., Hoebe, R.A., Essers, J., Kanaar, R., 2004. Dynamics of DNA Double-Strand Breaks Revealed by Clustering of Damaged Chromosome Domains. *Science (80-)*. 303, 92–95. doi:10.1126/science.1088845
- ATSDR, 2013. Toxicological Profile for Uranium. *Toxicol. profiles* 1–526. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/286524
- Banda, M., Bommineni, A., Thomas, R.A., Luckinbill, L.S., Tucker, J.D., 2007. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutat. Res. - Genet.*

- Toxicol. Environ. Mutagen. 649, 126–134. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.08.005
- Beer, L., Seemann, R., Ristl, R., Ellinger, A., Kasiri, M.M., Mitterbauer, A., Zimmermann, M., Gabriel, C., Gyöngyösi, M., Klepetko, W., Mildner, M., Ankersmit, H.J., 2014. High dose ionizing radiation regulates micro RNA and gene expression changes in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics* 15, 814. doi:10.1186/1471-2164-15-814
- Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M., 2008. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev. Cell* 14, 159–169. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.013
- Best, B., 1995. Mechanisms of aging. *J. Intern. Med* 238, 405–421.
- Bhattacharya, S., Asaithamby, A., 2016. Ionizing radiation and heart risks. *Semin. Cell Dev. Biol.* 58, 14–25. doi:10.1016/j.semcd.2016.01.045
- Bustin, S., 2008. Real-time quantitative PCR – opportunities and pitfalls. *Eur. Pharm. Rev.* 18–23.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55:4, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Carvalho, F.P., 2014. The National Radioactivity Monitoring Program for the Regions of Uranium Mines and Uranium Legacy Sites in Portugal. *Procedia Earth Planet. Sci.* 8, 33–37. doi:10.1016/j.proeps.2014.05.008
- Carvalho, F.P., Oliveira, J.M., 2007. Alpha emitters from uranium mining in the environment. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 274, 167–174. doi:10.1007/s10967-006-6914-3
- Carvalho, F.P., Oliveira, J.M., Faria, I., 2009a. Alpha Emitting Radionuclides in Drainage from Quinta do Bispo and Cunha Baixa Uranium Mines (Portugal) and Associated Radiotoxicological Risk. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 668–673. doi:10.1007/s00128-009-9808-3
- Carvalho, F.P., Oliveira, J.M., Malta, M., 2009b. Analyses of radionuclides in soil, water, and agriculture products near the Urgeiriça uranium mine in Portugal. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 281, 479–484. doi:10.1007/s10967-009-0027-5
- Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., Ruedel, H., 2003. Lessons from case studies of metals: Investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 45–51. doi:10.1016/S0147-6513(03)00049-6
- Cazzalini, O., Scovassi, A.I., Savio, M., Stivala, L.A., Prospero, E., 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat. Res. - Rev.*

- Mutat. Res. 704, 12–20. doi:10.1016/j.mrrev.2010.01.009
- Chen, C.H., Astrin, K.H., Lee, G., Anderson, K.E., Desnick, R.J., 1994. Acute intermittent porphyria: Identification and expression of exonic mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the housekeeping transcript causes “variant acute intermittent porphyria” with normal expres. *J. Clin. Invest.* 94, 1927–1937. doi:10.1172/JCI117543
- Cheng, C.-H., Luo, S.-W., Ye, C.-X., Wang, A.-L., Guo, Z.-X., 2016. Identification, characterization and expression analysis of tumor suppressor protein p53 from pufferfish (*Takifugu obscurus*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 59, 312–322. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.040
- Choudhury, A.R., Ju, Z., Djojotubroto, M.W., Schienke, A., Lechel, A., Schatzlein, S., Jiang, H., Stepczynska, A., Wang, C., Buer, J., Lee, H.-W., von Zglinicki, T., Ganser, A., Schirmacher, P., Nakauchi, H., Rudolph, K.L., 2007. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat. Genet.* 39, 99–105. doi:10.1038/ng1937
- Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, 2006. Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, *European Journal of Cancer*. National Academies Press, Washington, D.C. doi:10.17226/11340
- Conkrite, K., Sundby, M., Mu, D., Mukai, S., MacPherson, D., 2012. Cooperation between Rb and Arf in suppressing mouse retinoblastoma. *J. Clin. Invest.* 122, 1726–1733. doi:10.1172/JCI61403
- Craft, E.S., Abu-Qare, A.W., Flaherty, M.M., Garofolo, M.C., Rincavage, H.L., Abou-Donia, M.B., 2004. DEPLETED AND NATURAL URANIUM: CHEMISTRY AND TOXICOLOGICAL EFFECTS. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* 7, 297–317. doi:10.1080/10937400490452714
- Cristóbal, I., Garcia-Orti, L., Cirauqui, C., Cortes-Lavaud, X., García-Sánchez, M.A., Calasanz, M.J., Odero, M.D., 2012. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 97, 543–550. doi:10.3324/haematol.2011.050542
- Cunniffe, S.M.T., Lomax, M.E., O’Neill, P., 2007. An AP site can protect against the mutagenic potential of 8-oxoG when present within a tandem clustered site in *E. coli*. *DNA Repair (Amst)*. 6, 1839–1849. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.07.003
- Daino, K., Ichimura, S., Neno, M., 2006. Both the basal transcriptional activity of the

- GADD45A gene and its enhancement after ionizing irradiation are mediated by AP-1 element. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1759, 458–469.
doi:10.1016/j.bbaexp.2006.09.005
- Darolles, C., Broggio, D., Feugier, A., Frelon, S., Dublineau, I., De Meo, M., Petitot, F., 2010. Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicol. Lett.* 192, 337–348. doi:10.1016/j.toxlet.2009.11.009
- Decreto Lei nº23/2016 de 3 de junho de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, 2016.
- Dewar, D., Harvey, L., Vakil, C., 2013. Uranium mining and health. *Can. Fam. Physician* 59, 469–471.
- Dominguez, R., Holmes, K., 2011. Actin Structure and Function. NIH Public Access 169–186. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359.Actin
- Duffus, J.H., 2002. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 793–807. doi:10.1351/pac200274050793
- Duruibe, J.O., Ogwuegbu, C., Egwurugwu, J.N., 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.* 2, 112–118.
- Eccles, L.J., Lomax, M.E., O'Neill, P., 2009. Hierarchy of lesion processing governs the repair, double-strand break formation and mutability of three-lesion clustered DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 38, 1123–1134. doi:10.1093/nar/gkp1070
- EDM, 2013. Remediação Ambiental da Área Mineira da Cunha Baixa | [WWW Document]. URL <http://edm.pt/projetos/remediacao-ambiental-da-area-mineira-da-cunha-baixa/> (accessed 10.6.17).
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539. doi:10.2174/1568026013394831
- FACHIN, A.L., MELLO, S.S., SANDRIN-GARCIA, P., JUNTA, C.M., GHILARDI-NETTO, T., DONADI, E.A., PASSOS, G.A. da S., SAKAMOTO-HOJO, E.T., 2009. Gene Expression Profiles in Radiation Workers Occupationally Exposed to Ionizing Radiation. *J. Radiat. Res.* 50, 61–71. doi:10.1269/jrr.08034
- Falcão, J.M., Carvalho, F., Leite, M.M., Alarcão, M., Cordeiro, E., Ribeiro, J., 2006. MINURAR - Uranium mines and their residues: health effects in a Portuguese Population.
- Festa, F., Cristaldi, M., Ieradi, L.A., Moreno, S., Cozzi, R., 2003. The Comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Doñana National Park. *Environ. Res.* 91, 54–61. doi:10.1016/S0013-9351(02)00003-8
- Foote, R.H., Carney, E.W., 2000. The rabbit as a model for reproductive and

- developmental toxicity studies. *Reprod. Toxicol.* 14, 477–493. doi:10.1016/S0890-6238(00)00101-5
- Genovese, C., Trani, D., Caputi, M., Claudio, P.P., 2006. Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family. *Oncogene* 25, 5201–5209. doi:10.1038/sj.onc.1209652
- Goodarzi, A.A., Jonnalagadda, J.C., Douglas, P., Young, D., Ye, R., Moorhead, G.B.G., Lees-Miller, S.P., Khanna, K.K., 2004. Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 23, 4451–4461. doi:10.1038/sj.emboj.7600455
- Goodhead, D., Bramhall, R., Cox, R., Darby, S., Day, P., Harrison, J., Muihead, C., Roche, P., Simmons, J., Wakeford, R., Fairlie, I., Dorfman, P., Wright, E., 2002. Committee Examining Radiation Risks of Internal Emitters (CERRIE), *Journal of Radiological Protection*. doi:10.1088/0952-4746/22/2/604
- Goyer, R., Group, E.R., 2003. Issue paper on the human health effects of metals. U.S. Epa 1–48.
- Graham, B.M., Richardson, R., 2010. Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Extinction and Reduces Renewal of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology* 35, 1348–1355. doi:10.1038/npp.2010.3
- Grenthe, I., Drożdżynński, J., Fujino, T., Buck, E.C., Albrecht-Schmitt, T.E., Wolf, S.F., 2008. Uranium, in: *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 253–698. doi:10.1007/1-4020-3598-5_5
- Guleria, A., Chandna, S., 2016. ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA Repair (Amst)*. 39, 1–20. doi:10.1016/j.dnarep.2015.12.009
- Hada, M., Georgakilas, A.G., 2008. Formation of Clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A Review. *J. Radiat. Res.* 49, 203–210. doi:10.1269/jrr.07123
- Hagger, J. a, Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2, 312–329. doi:10.1002/ieam.5630020403
- Harfouche, G., Vaigot, P., Rachidi, W., Rigaud, O., Moratille, S., Marie, M., Lemaitre, G., Fortunel, N.O., Martin, M.T., 2010. Fibroblast growth factor type 2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells. *Stem Cells* 28, 1639–1648. doi:10.1002/stem.485
- Harrison, J., Day, P., 2008. Radiation doses and risks from internal emitters. *J. Radiol. Prot.* 28, 137–159. doi:10.1088/0952-4746/28/2/R01

- Health Canada, 2009. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document - Radiological Parameters. doi:No H144-13/2-2013E-PDF
- Henley, S.A., Dick, F.A., 2012. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div.* 7, 10. doi:10.1186/1747-1028-7-10
- Higashi, H., Vallböhmer, D., Warnecke-Eberz, U., Hokita, S., Xi, H., Brabender, J., Metzger, R., Baldus, S.E., Natsugoe, S., Aikou, T., Hölscher, A.H., Schneider, P.M., 2006. Down-regulation of Gadd45 expression is associated with tumor differentiation in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 26, 2143–2147.
- Holt, E.A., Miller, S.W., 2010. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts | Learn Science at Scitable. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 8.
- Huang, Y., Li, L., 2013. DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. *Transl Cancer Res.* 2, 144–154. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.03.01.
- Hung, M.-H., Wang, C.-Y., Chen, Y.-L., Chu, P.-Y., Hsiao, Y.-J., Tai, W.-T., Chao, T.-T., Yu, H.-C., Shiau, C.-W., Chen, K.-F., 2015. SET antagonist enhances the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by reactivating protein phosphatase 2A. *Oncotarget* 7, 638–55. doi:10.18632/oncotarget.6313
- IAEA, 2009. Hazardous Gas Helps Climate Scientists [WWW Document]. URL <https://www.iaea.org/newscenter/news/hazardous-gas-helps-climate-scientists> (accessed 10.19.17).
- IAEA, 2004. Radiation, People and the Environment, February 2004.
- IAEA, 2002. Safety Reports Series No. 27, in: Monitoring and Surveillance of Residues from the Mining and Milling of Uranium and Thorium. pp. 1–65.
- Iarovaia, O. V, Rubtsov, M., Ioudinkova, E., Tsfasman, T., Razin, S. V, Vassetzky, Y.S., 2014. Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Mol. Cancer* 13, 249. doi:10.1186/1476-4598-13-249
- Iyer, G., Wang, A.R., Brennan, S.R., Bourgeois, S., Armstrong, E., Shah, P., Harari, P.M., 2017. Identification of stable housekeeping genes in response to ionizing radiation in cancer research. *Nat. Publ. Gr.* 1–9. doi:10.1038/srep43763
- Jia, Y., Yu, X., Zhang, B., Yuan, Y., Xu, Q., Shen, Y., Shen, Y., 2004. An association study between polymorphisms in three genes activation protein) family and paranoid schizophrenia in northern Chinese population 19, 377–379. doi:10.1016/j.eurpsy.2004.07.006
- Korah, R., Choi, L., Barrios, J., Wieder, R., 2004. Expression of FGF-2 alters focal adhesion dynamics in migration- restricted MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast*

- Cancer Res. Treat. 88, 17–28. doi:10.1007/s10459-004-6006-2
- Korc, M., Friesel, R.E., 2009. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 639–651. doi:10.1007/978-1-62703-673-3
- Kozera, B., Rapacz, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 54, 391–406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x
- Kubota, E., Williamson, C.T., Ye, R., Elegbede, A., Peterson, L., Lees-Miller, S.P., Bebb, D.G., 2014. Low ATM protein expression and depletion of p53 correlates with olaparib sensitivity in gastric cancer cell lines. *Cell Cycle* 13, 2129–2137. doi:10.4161/cc.29212
- Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 182–186. doi:10.1016/S0025-326X(02)00449-6
- Lander, M., Pitt, A.R., Alefounder, P.R., Bardy, D., Abell, C., Battersby, A.R., 1991. Studies on the mechanism of hydroxymethylbilane synthase concerning the role of arginine residues in substrate binding. *Biochem. J.* 275, 447–452. doi:10.1042/bj2750447
- Larovaia, O. V, Rubtsov, M., Ioudinkova, E., Tsfasman, T., Razin, S. V, Vassetzky, Y.S., 2014. Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Mol. Cancer* 13, 1.
- Lassing, I., Schmitzberger, F., Björnstedt, M., Holmgren, A., Nordlund, P., Schutt, C.E., Lindberg, U., 2007. Molecular and Structural Basis for Redox Regulation of β -Actin. *J. Mol. Biol.* 370, 331–348. doi:10.1016/j.jmb.2007.04.056
- Lee, J.-H., Kim, H.-S., Lee, S.-J., Kim, K.-T., 2007. Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *J. Cell Sci.* 120, 2259–2271.
- Lemma, S., Avnet, S., Salerno, M., Chano, T., Baldini, N., 2016. Identification and validation of housekeeping genes for gene expression analysis of cancer stem cells. *PLoS One* 11, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0149481
- Lemos, J., Neuparth, T., Trigo, M., Costa, P., Vieira, D., Cunha, L., Ponte, F., Costa, P.S., Metello, L.F., Carvalho, A.P., 2017. Single Low-Dose Ionizing Radiation Induces Genotoxicity in Adult Zebrafish and its Non-Irradiated Progeny. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98, 190–195. doi:10.1007/s00128-016-2006-1
- Leonard, S.S., Bower, J.J., Shi, X., 2004. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol. Cell. Biochem.* 255, 3–10. doi:10.1023/B:MCBI.0000007255.72746.a6
- Levitt, N.C., Hickson, I.D., 2002. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol. Med.* 8, 179–186. doi:10.1016/S1471-4914(02)02298-0

- Li, G.-M., 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85–98. doi:10.1038/cr.2007.115
- Li, K., Brownley, A., 2010. Primer Design for RT-PCR. *RT-PCR Protoc.* Second Ed. *Methods Mol. Biol.* 630, 271–299. doi:10.1007/978-1-60761-629-0
- Li, M., Makkinje, A., Damuni, Z., 1996. The Myeloid Leukemia- associated Protein SET Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase 2A *. *J. Biol. Chem.* 271, 11059–11063.
- Linderholm, B.K., Lindh, B., Beckman, L., Erlanson, M., Edin, K., Travelin, B., Bergh, J., Grankvist, K., Henriksson, R., 2003. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. *Clin. Breast Cancer* 4, 340–7. doi:10.3816/CBC.2003.n.039
- Little, J.B., 2000. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 397–404.
- Lohr, J.G., Stojanov, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Chapuy, B., Sougnez, C., Rangel-escareño, C., Fernandez-lopez, J.C., Hidalgo-miranda, A., Melendez-zajgla, J., 2012. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Pnas* 109, 3879–3884. doi:10.1073/pnas.1121343109
- Lourenço, J., Marques, S., Carvalho, F.P., Oliveira, J., Malta, M., Santos, M., Gonçalves, F., Pereira, R., Mendo, S., 2017. Uranium mining wastes: The use of the Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET) test to evaluate toxicity and risk of environmental discharge. *Sci. Total Environ.* 605–606, 391–404. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.125
- Lourenço, J., Mendo, S., Pereira, R., 2016. Radioactively contaminated areas: Bioindicator species and biomarkers of effect in an early warning scheme for a preliminary risk assessment. *J. Hazard. Mater.* 317, 503–542. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.06.020
- Lourenço, J., Pereira, R., Gonçalves, F., Mendo, S., 2013a. Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. *Sci. Total Environ.* 443, 673–680. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.10.105
- Lourenço, J., Pereira, R., Gonçalves, F., Mendo, S., 2013b. SSH gene expression profile of *Eisenia andrei* exposed in situ to a naturally contaminated soil from an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88, 16–25. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.011
- Lourenço, J., Pereira, R., Pinto, F., Caetano, T., Silva, A., Carvalheiro, T., Guimarães, A., Gonçalves, F., Paiva, A., Mendo, S., 2013c. Biomonitoring a human population

- inhabiting nearby a deactivated uranium mine. *Toxicology* 305, 89–98.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.011>
- Lourenço, J., Pereira, R., Silva, A., Carvalho, F., Oliveira, J., Malta, M., Paiva, A., Gonçalves, F., Mendo, S., 2012. Evaluation of the sensitivity of genotoxicity and cytotoxicity endpoints in earthworms exposed in situ to uranium mining wastes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 46–54. doi:[10.1016/j.ecoenv.2011.08.024](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.024)
- Lourenço, J., Pereira, R., Silva, A., Morgado, J., Carvalho, F., Oliveira, J., Malta, M., Paiva, A., Mendo, S., Gonçalves, F., 2011a. Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides. *J. Hazard. Mater.* 186, 788–795. doi:[10.1016/j.jhazmat.2010.11.073](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.073)
- Lourenço, J., Silva, A., Carvalho, F., Oliveira, J., Malta, M., Mendo, S., Gonçalves, F., Pereira, R., 2011b. Histopathological changes in the earthworm *Eisenia andrei* associated with the exposure to metals and radionuclides. *Chemosphere* 85, 1630–1634. doi:[10.1016/j.chemosphere.2011.08.027](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.027)
- Malaquin, N., Carrier-Leclerc, A., Dessureault, M., Rodier, F., 2015. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front. Genet.* 5, 1–8. doi:[10.3389/fgene.2015.00094](https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00094)
- Marcheselli, M., Sala, L., Mauri, M., 2010. Bioaccumulation of PGEs and other traffic-related metals in populations of the small mammal *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* 80, 1247–1254. doi:[10.1016/j.chemosphere.2010.06.070](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.070)
- Marie, M., Hafner, S., Moratille, S., Vaigot, P., Mine, S., Rigaud, O., Martin, M.T., 2012. FGF2 mediates DNA repair in epidermoid carcinoma cells exposed to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 88, 688–693. doi:[10.3109/09553002.2012.706358](https://doi.org/10.3109/09553002.2012.706358)
- Mathew, B., Takekoshi, D., Sammani, S., Epshtein, Y., Sharma, R., Smith, B.D., Mitra, S., Desai, A.A., Weichselbaum, R.R., Garcia, J.G.N., Jacobson, J.R., 2015. Role of GADD45a in murine models of radiation- and bleomycin-induced lung injury. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 309, L1420–L1429.
doi:[10.1152/ajplung.00146.2014](https://doi.org/10.1152/ajplung.00146.2014)
- Matta, A., Siu, K.W.M., Ralhan, R., 2012. 14-3-3 zeta as novel molecular target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16, 515–523.
- Meek, D.W., 2004. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 3, 1049–1056. doi:[10.1016/j.dnarep.2004.03.027](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.027)
- Melton, D., Konecki, D., Brennand, J., Caskey, C.T., 1984. Structure, expression, and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2147–2151.

- Mirzayans, R., Murray, D., 2016. Expanding landscape of CDKN1A (p21) functions : CDKN1A- mediated radioresistance of dermal Langerhans cells and its impact on the immune system. *Transl. Cancer Res.* 5, 11–13. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2015.12.11
- Miyamoto, H., Shuin, T., Torigoe, S., Iwasaki, Y., Kubota, Y., 1995. Retinoblastoma. *Br. J. Cancer* 71, 831–835.
- Monzen, S., Chiba, M., 2015. mRNA Expression Profiles in Human Lymphoid Progenitor Cell are Modified by High-dose Ionizing Radiation, in: *Radiation Emergency Medicine*. pp. 35–39.
- Mukhacheva, S. V., Davydova, Y.A., Kshnyasev, I.A., 2010. Responses of small mammal community to environmental pollution by emissions from a copper smelter. *Russ. J. Ecol.* 41, 513–518. doi:10.1134/S1067413610060081
- Nambiar, M., Kari, V., Raghavan, S.C., 2008. Chromosomal translocations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1786, 139–152. doi:10.1016/j.bbcan.2008.07.005
- Narasimha, A.M., Kaulich, M., Shapiro, G.S., Choi, Y.J., Sicinski, P., Dowdy, S.F., 2014. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *Elife* 3, 1–21. doi:10.7554/eLife.02872
- Nascimento, C.S., Barbosa, L.T., Brito, C., Fernandes, R.P.M., Mann, R.S., Pinto, A.P.G., Oliveira, H.C., Dodson, M. V., Guimarães, S.E.F., Duarte, M.S., 2015. Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0127935
- NE, N.E., 2016. Radioactivity definition [WWW Document]. URL <https://nuclear-energy.net/definitions/radioactivity.html> (accessed 10.20.17).
- Neal, C.L., Yao, J., Yang, W., Zhou, X., Nguyen, N.T., Danes, C.G., Guo, H., Lan, K., Ensor, J., Hittelman, W., 2010. 14-3-3 ζ Overexpression Defines High Risk for Breast Cancer Recurrence and Promotes Cancer Cell Survival. *NIH Public Access* 69, 3425–3432. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2765.14-3-3
- NEI, 2017. How Nuclear Reactors Work - Nuclear Energy Institute [WWW Document]. URL <https://www.nei.org/Knowledge-Center/How-Nuclear-Reactors-Work> (accessed 10.6.17).
- Neves, M.O., Abreu, M.M., Figueiredo, V., 2012a. Uranium in vegetable foodstuffs: Should residents near the Cunha Baixa uranium mine site (Central Northern Portugal) be concerned? *Environ. Geochem. Health* 34, 181–189.

- doi:10.1007/s10653-011-9428-9
- Neves, M.O., Figueiredo, V.R., Abreu, M.M., 2012b. Transfer of U, Al and Mn in the water-soil-plant (*Solanum tuberosum* L.) system near a former uranium mining area (Cunha Baixa, Portugal) and implications to human health. *Sci. Total Environ.* 416, 156–163. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.11.065
- Neves, M.O., Matias, M.J., Basto, M.J., Abreu, M.M., Magalhaes, M.C.F., 2005. Abandoned mine site characterization for remediation: The case of the Cunha Baixa uranium mine (Viseu, Portugal), in: ENVIRONMENTAL CONTAMINATION FROM URANIUM PRODUCTION FACILITIES AND THEIR REMEDIATION. pp. 159–169.
- Neves, O., Abreu, M.M., Vicente, E.M., 2008. Uranium transfer in the water-soil-plant (*Lactuca sativa* L.) system at Cunha Baixa mine site. *e-Terra* 5, 1–8.
- Nolan, T., Manager, G., Support, T., Bustin, S., 2009. Article 3 : qPCR Assay Design. *Eur. Pharm. Rev.* 26–32.
- Nygaard, A.-B., Jørgensen, C.B., Cirera, S., Fredholm, M., 2007. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* 8, 67. doi:10.1186/1471-2199-8-67
- Oaks, J., Ogretmen, B., 2015. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Front. Oncol.* 4, 1–7. doi:10.3389/fonc.2014.00388
- Oliveira, A.M., Ross, J.S., Fletcher, J.A., 2005. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am. J. Clin. Pathol.* 124, 16–28. doi:10.1309/5XW3L8LU445QWGQR
- Ono, S., Hane, M., Kitajima, K., Sato, C., 2012. Novel regulation of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid. *J. Biol. Chem.* 287, 3710–3722. doi:10.1074/jbc.M111.276618
- Oost, D., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Organo, C., Fenton, D., 2008. Radiological assessment of NORM industries in Ireland- radiation doses to workers and members of the public. Radiological Protection Institute of Ireland (Ireland).
- Parmar, T.K., Rawtani, D., Agrawal, Y.K., 2016. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Front. Life Sci.* 9, 110–118. doi:10.1080/21553769.2016.1162753
- Pereira, A.J.S.C., Neves, L.J.P.F., Dias, J.M.M., Barbosa, S.V.T., 2004. Evaluation of radionuclide contamination in the vicinity of the Cunha Baixa and Quinta do Bispo old

- uranium mines (Central Portugal). *Radioprotecção* 2, 103–117.
- Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.M., Gonçalves, F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I Soil chemical characterization. *Sci. Total Environ.* 390, 377–386.
doi:10.1016/j.scitotenv.2007.08.051
- Pereira, R., Barbosa, S., Carvalho, F.P., 2013. Uranium mining in Portugal: A review of the environmental legacies of the largest mines and environmental and human health impacts. *Environ. Geochem. Health* 36, 285–301. doi:10.1007/s10653-013-9563-6
- Pfaffl, M., 2004. Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl, in: *A-Z of Quantitative PCR*. pp. 87–112. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10551-011-0963-1
- Pfeifer, G.P., 2010. Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes. *Genome Med.* 2, 1.
- Ponnaiya, B., Amundson, S.A., Ghandhi, S.A., Smilenov, L.B., Geard, C.R., 2013. Single-cell responses to ionizing radiation. *Radiat. Environ. Biophys* 52, 523–530.
doi:10.1007/s00411-013-0488-3
- Price, J., Idoyaga, J., Salmon, H., Hogstad, B., Bigarlle, C., Ghaffari, S., Leboeuf, M., Merad, M., 2015. The cell cycle inhibitor Cdkn1a regulates Langerhans cell radiation resistance and promotes T regulatory cell generation upon exposure to ionizing irradiation. *Nat. Immunol* 16, 1060–1068. doi:10.1038/nature15540.
- Qian, X., Li, X., Cai, Q., Liu, D.X., Jiang, T., Lu, Z., Qian, X., Li, X., Cai, Q., Zhang, C., Yu, Q., Jiang, Y., Lee, J., Hawke, D., 2017. to Induce Autophagy Article Phosphoglycerate Kinase 1 Phosphorylates. *Mol. Cell* 65, 1–15.
doi:10.1016/j.molcel.2017.01.027
- Quintens, R., Verreet, T., Janssen, A., Neefs, M., Leysen, L., Michaux, A., Verslegers, M., Samari, N., Pani, G., Verheyde, J., Baatout, S., Benotmane, M.A., 2015. Identification of novel radiation-induced p53-dependent transcripts extensively regulated during mouse brain development. *Biol. Open* 4, 331–44.
doi:10.1242/bio.20149969
- Rajalakshmi, T., AravindhaBabu, N., Shanmugam, K., Masthan, K.M.K., 2015. DNA adducts-chemical addons. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 7, 199. doi:10.4103/0975-7406.155901
- Rashi-Elkeles, S., Elkon, R., Shavit, S., Lerenthal, Y., Linhart, C., Kupershtein, A., Amariglio, N., Rechavi, G., Shamir, R., Shiloh, Y., 2011. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Mol. Oncol.* 5, 336–348.
doi:10.1016/j.molonc.2011.06.004

- Read, D., 2005. Characterization and risk assessment of sites contaminated by natural series radionuclides, International Atomic Energy Agency.
- Rodrigues, R., Lourenço, J., Pereira, P., Carvalho, S., Mendo, S., 2017. Effects of metal contamination on the gene expression profile of two benthic species: *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*. *Mar. Pollut. Bull.*
doi:10.1016/j.marpolbul.2017.08.014
- Roy, K., Wang, L., Makrigiorgos, G.M., Price, B.D., 2006. Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 821–826. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.222
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H., 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 332–337.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00216-7
- Sahbani, S.K., Girouard, S., Cloutier, P., Sanche, L., Hunting, D.J., 2014. The Relative Contributions of DNA Strand Breaks, Base Damage and Clustered Lesions to the Loss of DNA Functionality Induced by Ionizing Radiation. *Radiat. Res.* 181, 99–110.
doi:10.1667/RR13450.1
- Salvador, J.M., Brown-clay, J.D., Jr, A.J.F., 2013. Gadd45 Stress Sensor Genes. *Exp. Med. Biol.* 793, 1–19. doi:10.1007/978-1-4614-8289-5
- Sculley, D.G., Dawson, P.A., Emmerson, B.T., Gordon, R.B., 1992. A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. *Hum. Genet.* 90, 195–207. doi:10.1007/BF00220062
- Shah, C.A., Bei, L., Wang, H., Plataniias, L.C., Eklund, E.A., 2012. HoxA10 protein regulates transcription of gene encoding fibroblast growth factor 2 (FGF2) in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 287, 18230–18248. doi:10.1074/jbc.M111.328401
- Shan, Z., Li, G., Zhan, Q., Li, D., 2012. Gadd45a inhibits cell migration and invasion by altering the global RNA expression. *Cancer Biol. Ther.* 13, 1112–1122.
doi:10.4161/cbt.21186
- Shugart, L.R., 2000. DNA Damage as a Biomarker of Exposure. *Ecotoxicology* 9, 329–340. doi:10.1023/A:1026513009527
- Simone II, C.B., John-Aryankalayil, M., Palayoor, S.T.S.T., Makinde, A.Y.A.Y., Cerna, D., Falduto, M.T.M.T., Magnuson, S.R.S.R., Coleman, C.N.N., II, C.B.S., John-Aryankalayil, M., Palayoor, S.T.S.T., Makinde, A.Y.A.Y., Cerna, D., Falduto, M.T.M.T., Magnuson, S.R.S.R., Coleman, C.N.N., Simone, C.B., John-Aryankalayil, M., Palayoor, S.T.S.T., Makinde, A.Y.A.Y., Cerna, D., Falduto, M.T.M.T., Magnuson, S.R.S.R., Coleman, C.N.N., 2013. mRNA Expression Profiles for Prostate Cancer

- following Fractionated Irradiation Are Influenced by p53 Status. *Transl. Oncol.* 6, 573–585. doi:10.1593/tlo.13241
- Skwarzec, B., Strumińska-Parulska, D.I., Boryło, A., Kabat, K., 2012. Polonium, uranium and plutonium radionuclides in aquatic and land ecosystem of Poland. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 47, 479–496. doi:10.1080/10934529.2012.646153
- Sokolov, M., Neumann, R., 2014. Effects of low doses of ionizing radiation exposures on stress-responsive gene expression in human embryonic stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 588–604. doi:10.3390/ijms15010588
- Stern-Straeter, J., Bonaterra, G.A., Hörmann, K., Kinscherf, R., Goessler, U.R., 2009. Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC Mol. Biol.* 10, 66. doi:10.1186/1471-2199-10-66
- Stingele, J., Bellelli, R., Boulton, S.J., 2017. Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/nrm.2017.56
- Storozhuk, Y., Hopmans, S.N., Sanli, T., Barron, C., Tsiani, E., Cutz, J.-C., Pond, G., Wright, J., Singh, G., Tsakiridis, T., 2013. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK. *Br. J. Cancer* 108, 2021–2032. doi:10.1038/bjc.2013.187
- Stracker, T.H., Roig, I., Knobel, P.A., Marjanović, M., 2013. The ATM signaling network in development and disease. *Front. Genet.* 4, 1–19. doi:10.3389/fgene.2013.00037
- Sun, S., Liang, X., Zhang, X., Liu, T., Shi, Q., Song, Y., Jiang, Y., Wu, H., Jiang, Y., Lu, X., Pang, D., 2015. Phosphoglycerate kinase-1 is a predictor of poor survival and a novel prognostic biomarker of chemoresistance to paclitaxel treatment in breast cancer. *Br. J. Cancer* 112, 1332–1339. doi:10.1038/bjc.2015.114
- Sutherland, B.M., Bennett, P. V, Sidorkina, O., Laval, J., 2000. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 103–108. doi:10.1073/pnas.97.1.103
- Switzer, C.H., Cheng, R.Y.S., Vitek, T.M., Christensen, D.J., Wink, D.A., Vitek, M.P., 2011. Targeting SET/I2PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene* 30, 2504–2513. doi:10.1038/onc.2010.622
- Tamura, R., Vasconcellos, J., Sarkar, D., Libermann, T., Fisher, P., Zerbini, L., 2012. GADD45A proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med* 12, 634–651. doi:10.1086/498510.Parasitic
- Thangavel, C., Boopathi, E., Ciment, S., Liu, Y., O'Neill, R., Sharma, A., McMahon, S., Mellert, H., Addya, S., Ertel, A., Birbe, R., Fortina, P., Dicker, A., Knudsen, K., Den, R., 2014. The retinoblastoma tumor suppressor modulates DNA repair and

- radioresponsiveness. *Clin Cancer Res* 20, 1–20. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0034.PD-L1
- Tront, J.S., Huang, Y., Fornace, A.A., Hoffman, B., Liebermann, D.A., 2010. Gadd45a functions as a promoter or suppressor of breast cancer dependent on the oncogenic stress. *Cancer Res.* 70, 9671–9681. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2177
- Turner, N., Grose, R., 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 116–129. doi:10.1038/nrc2780
- Ulbrichova, D., Hrdinka, M., Saudek, V., Martasek, P., 2009. Acute intermittent porphyria - Impact of mutations found in the hydroxymethylbilane synthase gene on biochemical and enzymatic protein properties. *FEBS J.* 276, 2106–2115. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06946.x
- Umesako, S., Fujisawa, K., Iiga, S., Mori, N., Takahashi, M., Hong, D.-P., Song, C.-W., Haga, S., Imai, S., Niwa, O., Okumoto, M., 2005. Atm heterozygous deficiency enhances development of mammary carcinomas in p53 heterozygous knockout mice. *Breast Cancer Res.* 7, R164–R170. doi:10.1186/bcr968
- UNSCEAR, 2000. Sources and effects of ionizing radiation: sources. United Nations Publications.
- Vahakangas, K.H., Metcalf, R.A., Welsh, J.A., Bennett, W.P., Harris, C.C., Samet, J.M., Lane, D.P., 1992. Mutations of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium miners. *Lancet* 339, 576–580. doi:10.1016/0140-6736(92)90866-2
- van Heemst, D., den Reijer, P.M., Westendorp, R.G.J., 2007. Ageing or cancer: A review. On the role of caretakers and gatekeepers. *Eur. J. Cancer* 43, 2144–2152. doi:10.1016/j.ejca.2007.07.011
- Venkata Narayanan, I., Paulsen, M.T., Bedi, K., Berg, N., Ljungman, E.A., Francia, S., Veloso, A., Magnuson, B., di Fagagna, F. d'Adda, Wilson, T.E., Ljungman, M., 2017. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the ionizing radiation response by ATM and p53. *Sci. Rep.* 7, 43598. doi:10.1038/srep43598
- Vidaud, C., Dedieu, A., Basset, C., Plantevin, S., Dany, I., Pible, O., Quemeneur, E., 2005. Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chem Res Toxicol* 18, 946–953. doi:10.1021/tx050038v
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310. doi:10.1038/35042675
- Walder, R.Y., Wattiez, A.-S., White, S.R., de Prado, B.M., Hamity, M. V, Hammond, D.L., 2014. Validation of Four Reference Genes for Quantitative mRNA Expression Studies in a Rat Model of Inflammatory Injury. *Mol. Pain* 10, 1744-8069-10–55.

- doi:10.1186/1744-8069-10-55
- WEC, 2016. World Energy Scenarios 2016 report: Global energy demand growth set to fall [WWW Document]. URL <https://www.worldenergy.org/news-and-media/press-releases/world-energy-scenarios-2016-report-global-energy-demand-growth-set-to-fall/> (accessed 10.8.17).
- WHO, 2017. Chapter 9: Radiological aspects, in: Guidelines for Drinking Water Quality. pp. 203–218.
- Wiese, C., Rudolph, J.H., Jakob, B., Fink, D., Tobias, F., Blattner, C., Taucher-Scholz, G., 2012. PCNA-dependent accumulation of CDKN1A into nuclear foci after ionizing irradiation. *DNA Repair (Amst)*. 11, 511–521. doi:10.1016/j.dnarep.2012.02.006
- Winfield, M., Jamison, A., Wong, R., Czajkowski, P., 2006. Nuclear power in Canada : an examination of risks, impacts and sustainability.
- Wingert, S., Rieger, M.A., 2016. Terminal differentiation induction as DNA damage response in hematopoietic stem cells by GADD45A. *Exp. Hematol.* 44, 561–566. doi:10.1016/j.exphem.2016.04.006
- WNA, 2017. World Nuclear Association - World Nuclear Association [WWW Document]. URL <http://www.world-nuclear.org/> (accessed 10.6.17).
- Wood, M.L., Essigmann, J.M., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., 1990. Mechanistic Studies of Ionizing Radiation and Oxidative Mutagenesis: Genetic Effects of a Single 8-Hydroxyguanine (7-Hydro-8-oxoguanine) Residue Inserted at a Unique Site in a Viral Genome. *Biochemistry* 29, 7024–7032. doi:10.1021/bi00482a011
- Yang, C.-C., Kuo, H.-C., You, H.-L., Wang, J., Huang, C.-C., Liu, C.-Y., Lan, M.-Y., Stephenson, D.A., Lee, M.-J., 2008. *HMB5* Mutations in Chinese Patients with Acute Intermittent Porphyria. *Ann. Hum. Genet.* 72, 683–686. doi:10.1111/j.1469-1809.2008.00463.x
- Yang, F., Zhang, W., Li, D., Zhan, Q., 2013. Gadd45a suppresses tumor angiogenesis via inhibition of the mTOR/STAT3 protein pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 6552–6560. doi:10.1074/jbc.M112.418335
- Yin, M., Jiang, W., Fang, Z., Kong, P., Xing, F., Li, Y., 2015. Generation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene knockout rabbits by homologous recombination and gene trapping through somatic cell nuclear transfer. *Nat. Publ. Gr.* 1–11. doi:10.1038/srep16023
- Yu, H., 2012. Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage. *Chinese J. Cancer Res.* 24, 83–89. doi:10.1007/s11670-012-0083-1

Zhu, W., Lin, Y., Liao, H., Wang, Y., 2015. Selection of reference genes for gene expression studies related to intramuscular fat deposition in *Capra hircus* skeletal muscle. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0121280