

2.02.06 - Genética / Mutagenese

## CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DA LUZ SOLAR E MONITORAMENTO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOLAR EM SANTA MARIA/RS, BRASIL

Lucas M. M. Doyle<sup>1\*</sup>, James E. L. Londero<sup>2</sup>, André P. Schuch<sup>3</sup>

1. Estudante de IC de ciências biológicas da UFSM

2. Mestrando de bioquímica da UFSM

3. Professor da UFSM / Orientador

### Resumo:

Cada comprimento de onda da radiação UV tem um impacto biológico diferente, sendo assim, caracterizamos o potencial genotóxico da luz solar em Santa Maria/RS, em diferentes estações do ano. Amostras de DNA plasmidial foram expostas à luz solar através do dosímetro de DNA e em seguida foram tratadas com diferentes enzimas que clivam danos de DNA específicos. Com essas enzimas é possível quantificar e qualificar os danos do DNA. Paralelamente a isso, radiômetros estão medindo, desde 2005, a incidência diária de UVB e UVA, esse banco de dados foi analisado para montar o perfil da incidência de UVB e UVA. Os resultados indicam que a incidência de UVB muda drasticamente com as estações do ano, enquanto a UVA é mais estável. As exposições do dosímetro de DNA indicam que a formação de dano oxidativo e CPDs é alta. Essas informações podem ajudar a tomar decisões para elaborar programas para alertar a população sobre os efeitos da luz solar.

**Palavras-chave:** Dosímetro biológico; Danos de DNA; Fotobiologia

**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** Universidade Federal de Santa Maria.

### Introdução:

A maioria dos seres vivos está exposta à radiação UV, que é um dos mais importantes agentes mutagênicos ambientais. Nos dias atuais é de conhecimento da comunidade científica que a radiação UV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pele. Além da formação de tumores, a exposição solar em excesso resulta em processos de morte celular, tanto por necrose ou apoptose. A morte celular gera efeitos em longo prazo, como o fotoenvelhecimento e catarata, mas também em curto prazo como as queimaduras. Nos ecossistemas também há consequências da exposição em excesso à luz solar, pois muitas espécies são sensíveis a UV. A espécie de anfíbio *Hypsiboas curupi* é um exemplo que está em declínio devido à alta exposição à radiação UV em consequência do desmatamento de áreas florestais.

Quando amostras biológicas são expostas à luz UV ocorre a formação de muitos tipos de lesões de DNA, a absorção de UVB, pelas bases nitrogenadas do DNA gera, principalmente, reações de dimerização entre as bases de pirimidina adjacentes. Entre essas reações de dimerização encontram-se os dímeros de pirimidina *Cis-syn*-ciclobutano (CPDs) e os 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs).

Há também a formação de danos induzidos de forma indireta. A energia absorvida dos raios UV pode ser transferida para o oxigênio molecular, desta maneira formando espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs induzidas pela radiação UV incluem o oxigênio singlete, o radical superóxido e até mesmo radicais hidroxilas, que são altamente reativos. Geralmente esses radicais interagem com a base guanina, gerando uma série de alterações morfológicas, dentre as quais se destaca a 7, 8-dihidro-8-oxiguanina (8-oxoG) que tem como consequência mutações do tipo transversões G – T e A – C.

Existem aparelhos que são capazes de medir a intensidade da radiação UV, chamados de radiômetros ou espectralradiômetros. Os radiômetros são capazes de medir UVA ou UVB separadamente através de um filtro. Por outro lado, dosímetros biológicos apresentam uma forma direta de se avaliar os impactos danosos da luz solar nos seres vivos. Desta forma, o sistema dosímetro de DNA possibilita uma qualificação e quantificação eficiente das lesões no DNA induzidas pela radiação UV solar.

O objetivo desse projeto é caracterizar o potencial genotóxico da luz solar no município de Santa Maria/RS, por meio da correlação de dados físicos de incidência de radiação UVA e UVB com biológicos de indução de lesões na molécula de DNA.

### Metodologia:

O monitoramento da incidência de radiação UVB e UVA será feito por meio do uso radiômetros específicos (UV-B Radiometer e UV-A Radiometer, EKO Instruments Trading Co. Ltd., Japão), que estão instalados e em funcionamento no Laboratório de Radiação Ultravioleta e Fotobiologia. Estes equipamentos vêm monitorando continuamente a incidência desses dois tipos de radiação UV solar na cidade de Santa Maria/RS (29°41'S; 53°48'O) desde o ano de 2005.

O protótipo Dosímetro de DNA será empregado com o propósito de quantificar os diferentes tipos de lesões de DNA induzidas pela luz solar. Esse biossensor oferece uma maneira confiável e reprodutível para se quantificar as lesões de DNA geradas após um tempo desejado de irradiação.

Para determinar os danos causados radiação UV solar, amostras de 300ng de DNA plasmidial serão expostas ao sol e depois tratadas com 3µl da enzima T4-endonuclease V, fornecida pelo Laboratório de Reparo de DNA do Departamento de Microbiologia/ICB – USP (T4 – proveniente do bacteriófago T4 que reconhece especificamente CPDs), 1µl da enzima Formamidopirimidina-DNA glicosilase (Fpg – proveniente de *E. coli* e reconhece purinas oxidadas) (New England Biolabs, USA) e 1µl da enzima endonuclease III (ENDO III) que reconhece pirimidinas oxidadas, além dos tratamentos com as enzimas há uma amostra onde não é adicionada enzima, com isso podemos saber quantas quebras simples (SSB) temos no DNA. As reações enzimáticas serão realizadas por 60 minutos a 37°C. Essas enzimas possuem a capacidade de reconhecer lesões de DNA específicas e de clivar a ligação fosfodiéster no sítio da lesão, resultando no relaxamento de moléculas de DNA plasmidial superenoveladas.

A determinação e quantificação dos diferentes tipos de danos de DNA formados serão feitas por eletroforese em gel de agarose 1% seguidas de análises de densitometria das bandas de DNA do gel (Image Quant 300, GE Healthcare, USA).

O número de sítios sensíveis às enzimas por kbp corresponde a uma distribuição de Poisson. Baseado nessa premissa, pode se calcular o número de lesões através da seguinte fórmula:

$$X = -\ln(1,4*FI/1,4*FI+FII) / 1,8$$

O cálculo obedece a determinação de frequência de moléculas sem lesão alguma (DNA superenovelado). Onde, X é o número de quebras na molécula de DNA plasmidial por kbp, FI representa a intensidade de fluorescência medida na banda de DNA superenovelado (forma I), FII representa a intensidade de fluorescência medida na banda de DNA circular relaxada (forma II), 1,4 é um fator aplicado para corrigir o excesso de fluorescência devido a maior capacidade de ligação do brometo de etídio ao DNA na forma circular relaxada e 1,8 é o tamanho aproximado do vetor pCMUT em kbp.

### Resultados e Discussão:

O monitoramento da radiação UV desde 2005 mostrou que, enquanto a radiação UVB tem uma drástica mudança dentre as estações do ano, aumentando cerca de quatro vezes do inverno para o verão (Figura 1), a radiação UVA é mais estável, aumentando cerca de duas vezes e meia (Figura 2). Além disso, como o esperado, a radiação UV é significativamente maior no verão. Por outro lado, a radiação UVB está superconcentrada no período das 10h às 16h, nesse período podemos ter até 90% da radiação UVB diária (Figura 3), a medida que a radiação UVA está mais dispersa ao longo do dia (Figura 4). Ainda podemos notar que há uma tendência a ter uma maior concentração da radiação nos meses mais frios, que compreendem o outono e o inverno.

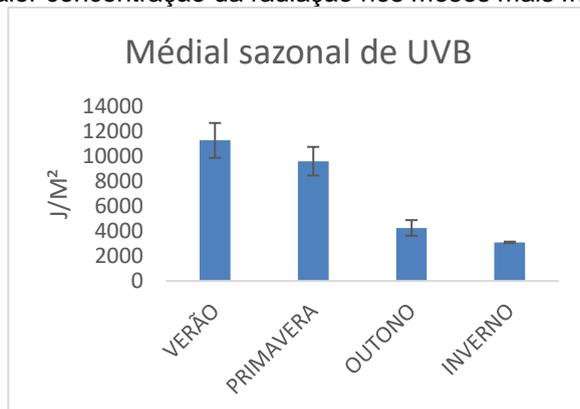


Figura 1: Média da incidência de UVB nas estações do ano em Santa Maria entre 2005 e 2017.

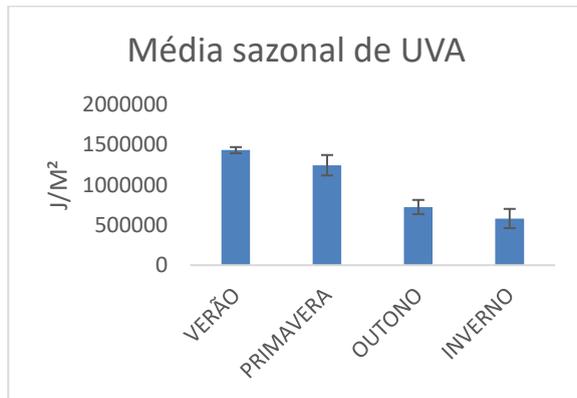


Figura 2: Média da incidência de UVA nas estações do ano em Santa Maria entre 2005 e 2017.

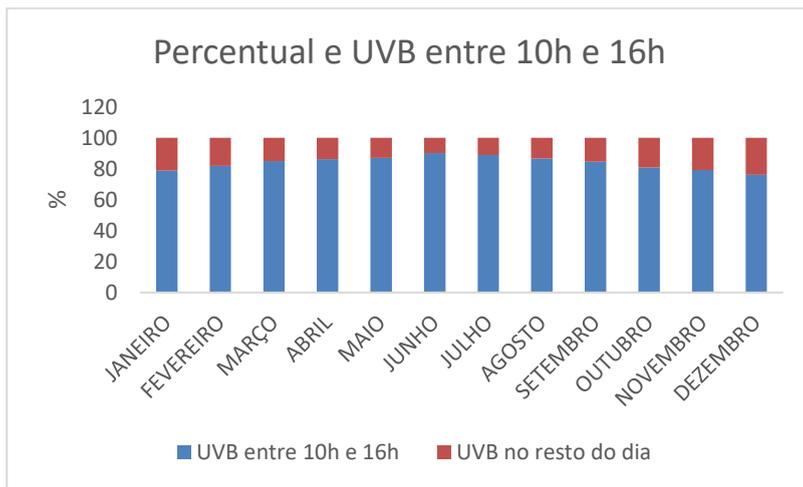


Figura 3: Percentual da radiação UVB incidente no período entre 10h e 16h comparado com o total de UVB diário.

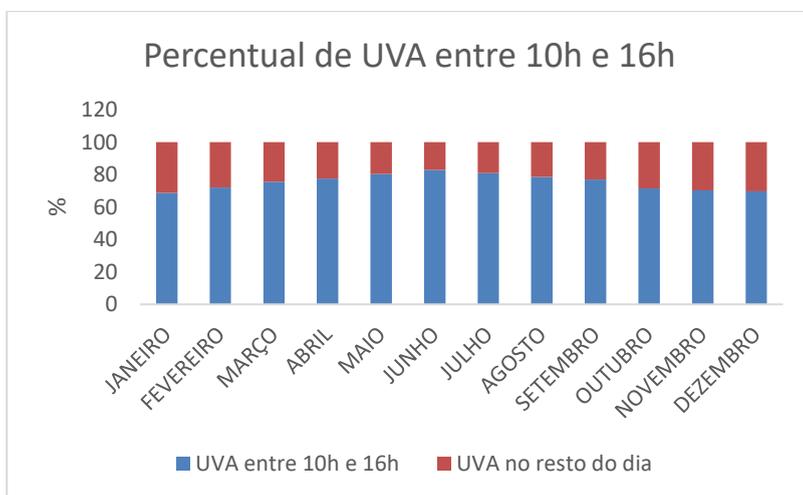


Figura 4: Percentual da radiação UVA incidente no período entre 10h e 16h comparado com o total de UVA diário.

Além disso, com as exposições do dosímetro de DNA é possível ver uma alta taxa de formação de dano oxidativo em purinas comparado aos outros tipos de dano, como CPDs e pirimidinas oxidadas (Figura 5).

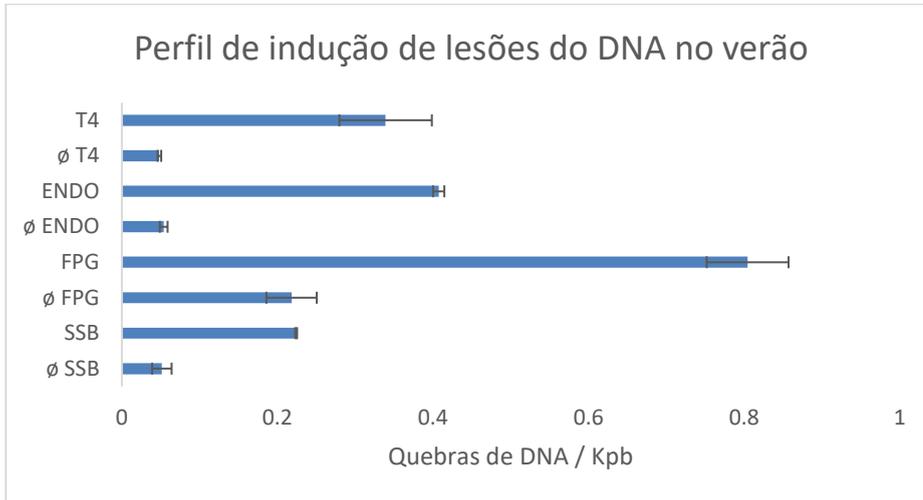


Figura 5: Indução de lesões de DNA após exposições do dosímetro de DNA, os resultados apresentam média e desvio padrão de experimentos realizados nos dias 5, 9 e 20 de Janeiro de 2018. As amostras controle (Ø) também são expostas, mas são cobertas com papel alumínio.

Os resultados mostram que a incidência de radiação UV na primavera é quase tão alta como no verão, havendo assim uma necessidade de alertar a população sobre o perigo de ficar exposto ao sol em horários críticos durante a primavera também. Por outro lado a qualificação e quantificação das lesões causadas no DNA podem auxiliar na criação de protetores solares com fórmulas químicas específicas para a região de Santa Maria.

### Conclusões:

Como o esperado a incidência de radiação UV é menor no inverno e no outono e tem um aumento drástico na primavera e no verão. Como a variação da radiação UVB é muito maior que a variação da radiação UVA entre as estações, espera-se que no inverno e no outono a relação de dímeros de pirimidina e danos oxidativos aumente. Ao término dos experimentos biológicos de caracterização de danos, será possível ter um perfil de lesões sazonal causadas pela radiação UV em Santa Maria.

### Referências bibliográficas

- A. Takahashi and T. Ohnishi, The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station, *Biol. Sci. Space*, 2004, 18, 255–260.
- Z. Kuluncsics, D. Perdiz, E. Brulay, B. Muel and E. Sage, Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1999, 49, 71–80.
- Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of non-melanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 May 1;90(9):4216-20
- Piette J, Merville-Louis MP, Decuyper J. Damages induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem Photobiol*. 1986 Dec;44(6):793-802
- Schuch AP, da Silva Galhardo R, de Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CF. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2009 Jan;8(1):111-20
- Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*. 2000 Sep 1;275(35):26732-42.
- Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, et al. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)*. 2005 Jul 12;4(7):836-44.

Lipinski VM, dos Santos TG, Schuch AP. An UV-sensitive anuran species as an indicator of environmental quality of the Southern Atlantic Rainforest. *Journal of photochemistry and photobiology, B: biology*. 2016 October 165 (2016) 174–181.

Schuch AP, Lago JC, Yagura T, Menck CF. DNA dosimetry assessment for sunscreen genotoxic photoprotection. *PLoS One*. 2012;7(6): e40344. Epub 2012 Jun 29.