

Investigação do efeito da poluição atmosférica na integridade do DNA mitocondrial

Alice Helena Baldani Diatroptoff

Nadja Cristhina de Souza Pinto

Universidade de São Paulo

alice.helena1@usp.br

Objetivos

Nosso laboratório iniciou um estudo focado no efeito de contaminantes ambientais sobre a integridade do DNA mitocondrial (mtDNA), utilizando uma mistura específica contendo 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Esses compostos, embora possam ser produzidos naturalmente pela queima de matéria orgânica, são gerados principalmente pela queima de combustíveis fósseis, contribuindo significativamente para a poluição atmosférica em grandes centros urbanos, principalmente associados a partículas de material particulado.

Neste contexto, o objetivo do projeto é avaliar o impacto de amostras complexas de contaminantes atmosféricos sobre a integridade do DNA mitocondrial em células humanas em cultura. Para atingir esse objetivo, propomos os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar se a exposição de células humanas em cultura à mistura complexa de contaminantes atmosféricos induz o acúmulo de lesões no DNA nuclear e mitocondrial;
2. Verificar se essa exposição provoca alterações no número de cópias do DNA mitocondrial nas células expostas

em comparação com as células de controle;

3. Avaliar se a exposição afeta a função mitocondrial por meio da análise da bioenergética celular.

Métodos e Procedimentos

Amostras: Como o efeito da mistura definida de HPAs na formação de lesões em mtDNA nunca foi medido, utilizamos uma mistura comercial padrão (Aromatic Hydrocarbon Standard, Agilent #SMA-301-1), cuja composição química foi previamente determinada. **Cultura celular:** A linhagem A549, derivada de adenocarcinoma pulmonar humano, foi cedida pelo Prof. Dr. Carlos Menck (ICB, USP). As culturas foram mantidas em DMEM com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, a 37°C e 5% de CO₂. O tratamento com HPAs seguiu as densidades e diluições previamente estabelecidas no grupo (Claudio, G.A., dissertação, IQ-USP, 2023).

Determinação de lesões em DNA: A frequência de lesões em DNA foi avaliada pelo método de long extension PCR, descrito em Mori et al., 2017, que analisa o bloqueio da polimerase em amplicons longos, com normalização pela amplificação de um

amplicon curto. O protocolo foi adaptado de Kovalenko & Santos, 2009.

Resultados

Para determinar a frequência de lesões induzidas no mtDNA pelos tratamentos com HPAs, amplificamos um fragmento longo de 10 kb e um fragmento curto de cerca de 120 pares de bases, que serve para normalizar a quantidade de DNA em cada reação. A normalização é baseada na ideia de que a frequência de lesões no fragmento curto é baixa o suficiente e, portanto, a eficiência de amplificação desse fragmento depende apenas da quantidade inicial de DNA.

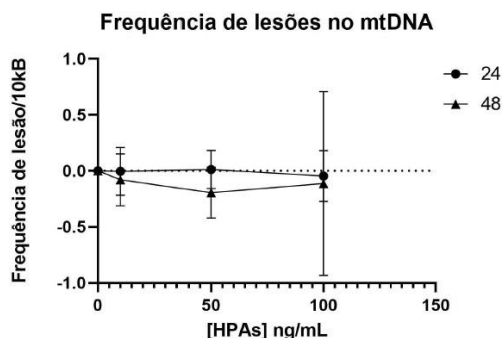


Figura 1: Frequência de lesões por 10 kb em mtDNA de células A549 expostas a diferentes concentrações de HPAs por 24 ou 48 hr. As culturas foram processadas como descrito. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 replicatas biológicas, quantificadas em duplicata.

Conclusões

Embora os resultados obtidos até o momento demonstrem uma tendência no aumento de lesões no tratamento de 100 ng/ml da solução padrão de HPAs em período de exposição de 48 horas, são necessários mais experimentos

para alcançar uma conclusão definitiva. A continuidade das investigações experimentais será fundamental para confirmar as tendências observadas e assegurar a confiabilidade e precisão dos dados.

Agradecimentos

Financiamento: Bolsas da FAPESP 2017/04372-0 para NCS-P e AHBD é apoiado por uma bolsa PUB/USP.

Referências

1. Kovalenko, O.A.; Santos, J. H. (2009) Analysis of oxidative damage by genespecific quantitative PCR. Current Protocols in Human Genetics.
2. United Nations. *Sustainable Development Goals*. Retirado de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/> acesso em 2024.
3. International Agency for Research on Cancer [homepage on the Internet]. Lyon: IARC. Monographs available in PDF format. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>. Acesso em 2024.
4. Mori, M.P. et al., Lack of XPC leads to a shift between respiratory complexes I and II but sensitizes cells to mitochondrial stress. *Scientific Rep.*, 13;7(1):155. doi: 10.1038/s41598-017-00130-x.