TEITI YAGURA

**Mecanismos de indução de lesões no DNA
pela luz UVA e seus efeitos biológicos**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para a obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**São Paulo
2012**

TEITI YAGURA

**Mecanismos de indução de lesões no DNA
pela luz UVA e seus efeitos biológicos**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para a obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

Área de concentração: Biotecnologia

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico
Martins Menck**

Co-orientador: Dr. André Passaglia Schuch

Versão original

**São Paulo
2012**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Yagura, Teiti.

Mecanismos de indução de lesões no DNA pela luz UVA e seus efeitos biológicos / Teiti Yagura. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Fotobiologia.

Versão do título para o inglês: Mechanisms of induction of DNA lesions by UVA light and its biological effects.

1. Radiação ultravioleta 2. DNA 3. Danos do DNA I. Menck, Prof. Dr. Carlos Frederico Martins II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB049/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Teiti Yagura.

Título da Dissertação: Mecanismos de indução de lesões no DNA pela luz UVA e seus efeitos biológicos.

Orientador(a): Prof. Dr.Carlos Frederico Martins Menck.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 381/10 referente ao projeto intitulado: "*Mecanismos de indução de lesões no DNA pela Luz UVA e seus efeitos biológicos*" sob a responsabilidade de **Teiti Yagura**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 14 de maio de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedicado a todas as pessoas e coisas com que tive contato nesses anos todos, que me proporcionaram tantas alegrias e sofrimentos. Sim, pois as maiores lições da vida tiramos dos sofrimentos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Carlos F. M. Menck, um cientista brilhante, que me acolheu desde a iniciação científica, possibilitando minha formação e fazendo-me perceber a beleza da Ciência.

Ao Dr. André P. Schuch, com quem tive o privilégio de trabalhar e conviver, por me orientar e me dar lições de pragmatismo.

À Dra. Camila C. M. Garcia, que me ajudou grandemente, somando qualidade a meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio e à Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, por me permitirem realizar experimentos em seus laboratórios.

À Clarissa R. R. Rocha que, além de ajudar todos do laboratório com os experimentos de HCR, também teve tempo de colaborar comigo nesses ensaios.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Reparo de DNA do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela colaboração e companhia.

Aos professores e funcionários da USP e à própria USP, por me proporcionarem excelentes condições de formação profissional e pessoal.

Ao Dr. Hiromasa Yamamoto da Universidade de Takushoku e ao Dr. Kazuo Makita da Universidade de Rikkyo, Japão, com quem pude colaborar.

À Jodo Shinshu Shinrankai, pela qual tive a chance de encontrar o Budismo, que me ensina sobre o objetivo da vida de toda a humanidade, que é a Felicidade Absoluta.

A minha família, que foi minha base desde meu nascimento, proporcionando condições de educação que culminaram com a oportunidade de poder entrar na Universidade de São Paulo.

À Srta. Kelly Yumi Assahi, que me ensinou o significado da palavra “amor”.

Enfim, agradeço a todos que participaram e ajudaram de diferentes maneiras na realização deste trabalho.

“If there is any religion that would cope with modern scientific needs it would be
Buddhism.”

Albert Einstein

RESUMO

YAGURA, T. **Mecanismos de indução de lesões no DNA pela luz UVA e seus efeitos biológicos**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A luz UVA é pouco absorvida pela molécula de DNA, mas trabalhos recentes apontam para um mecanismo direto de lesão ao DNA por comprimentos de onda de UVA. Estes também são capazes de excitar cromóforos endógenos, que geram lesões por intermédio de espécies reativas. Utilizando um dosímetro de DNA, irradiamos amostras de DNA com luz UVA em diferentes condições para estudar os possíveis mecanismos envolvidos na indução de lesões de DNA por esses comprimentos de onda. Os diferentes tipos de lesões de DNA formados após as irradiações foram quantificados com a utilização de enzimas de reparo de DNA (Fpg e T4-endonuclease V) que reconhecem e clivam os sítios contendo lesões como bases oxidadas e dímeros de pirimidina (CPDs), respectivamente. Complementando essas análises, foram realizados ensaios com anticorpos específicos para cada tipo de lesão. A formação de 8-oxodesoxiguanosina (8-oxodG) também foi estudada de forma mais detalhada por meio de HPLC-ED. Os resultados mostram que NaCl e uma maior concentração de DNA são capazes de diminuir a indução de CPDs. Com relação aos danos gerados por estresse oxidativo, sua indução é diminuída na presença de azida de sódio e quelantes de metais, indicando o envolvimento de oxigênio singlete e reações de Fenton (ou Fenton-like), respectivamente, na geração dessas lesões. Por outro lado, água deuterada e DNA mais concentrado aumentaram a indução de bases oxidadas. Uma observação interessante é a de que, quanto maior a quantidade de DNA irradiado, mais oxigênio singlete é formado, o que indica um possível mecanismo de fotossensibilização endógeno. Esses experimentos contribuem com a elucidação dos mecanismos formação de lesões de DNA por essa radiação, que é um dos mais abrangentes agentes genotóxicos exógenos a que estamos expostos.

Palavras-chave: Radiação Ultravioleta. DNA. Danos do DNA.

ABSTRACT

YAGURA, T. **Mechanisms of induction of DNA lesions by UVA light and its biological effects**. 2012. 78 p. Master's dissertation (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

UVA light is little absorbed by the DNA molecule, but recent works point to a direct mechanism of DNA lesion by UVA wavelengths. These are also able to excite endogenous chromophores which generate lesions on DNA through reactive species. Using a DNA-dosimeter, DNA samples were irradiated with UVA light in different conditions for studying the possible mechanisms involved in the induction of DNA lesions by these wavelengths. The different types of DNA lesions formed after irradiation were determined by the use of DNA repair enzymes (Fpg and T4 endonuclease V), which recognize and cleave the sites containing lesions such as oxidized bases and pyrimidine dimers (CPDs), respectively. Complementing these analyses, tests were performed with specific antibodies for each type of injury. The formation of 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) was also studied in more detail by means of HPLC-ED. The results show that a higher NaCl concentration and more concentrated DNA are capable of reducing the induction of CPDs. With respect to damage caused by oxidative stress, its induction is reduced in the presence of sodium azide and metal chelators, indicating the involvement of singlet oxygen and Fenton reactions (or Fenton-like), respectively, in the generation of these lesions. Moreover, more concentrated DNA and deuterium increased the induction of oxidized bases. An interesting observation is that, the bigger the amount of irradiated DNA, the more singlet oxygen is formed, which indicates a possible endogenous photosensitization mechanism. These experiments contribute to the elucidation of the mechanisms of formation of DNA lesions by this radiation, which is one of the broadest exogenous genotoxic agents to which we are exposed.

Key Words: Ultraviolet Radiation. DNA. DNA damage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Espectro de emissão da lâmpada Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W. Espectro obtido por espectrorradiômetro HR4000 da Ocean Optics (Dunedin, FL, EUA). A temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram medidas por um termo-higrômetro LV12168/06, da Visomes (São Paulo, SP, Brasil), variando entre 21 °C a 22 °C e 60% a 70% (abaixo do filtro), respectivamente.26
- Figura 2** - Exemplo ilustrativo de gel de agarose com amostras incubadas com enzimas Fpg e T4-endo V, com as respectivas quantificações absoluta e relativa. A) Fotografia de gel; B) Quantidade absoluta de ESS/kbp; C) Quantidade relativa de ESS/kbp (em %).28
- Figura 3** - Formação de T4-endo V-SS (CPDs) em DNA plasmidial após sua irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA na presença de NaCl ou DNA em alta concentração. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. A notação “depois” indica que a substância foi adicionada após a irradiação, mas antes da incubação enzimática. Experimento realizado em triplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001.33
- Figura 4** - Detecção de CPDs por anticorpo específico após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em duplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. * 0,01 < P < 0,05; ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001.34
- Figura 5** - Formação de sítios sensíveis a Fpg (Fpg-SS) após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. A notação “depois” indica que a substância foi adicionada após a irradiação, mas antes da incubação enzimática. Experimento realizado em triplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. *** P < 0,001.35
- Figura 6** - Formação de sítios sensíveis a Fpg (Fpg-SS) após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA alterando-se a concentração de DNA. Experimento realizado em triplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. ** 0,001 < P < 0,0136

Figura 7 - Detecção de 8-oxodG com anti-8-oxodG após irradiação com 500 kJ/m ² de luz UVA na presença de NaN ₃ e NaCl. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em duplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001.	37
Figura 8 - Detecção de lesões 8-oxodG por HPLC acoplado a detector eletroquímico após irradiação com 500 kJ/m ² de luz UVA nas condições indicadas na figura. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em duplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. * 0,01 < P < 0,05; ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001; ns: não significativo.	38
Figura 9 - Detecção de AVSO ₂ (medida indireta de formação de oxigênio singlete) por HPLC acoplado a detector UV após irradiação de concentrações crescentes de DNA com 500 kJ/m ² de luz UVA. O AVSO ₂ corresponde ao AVS em sua forma oxidada por oxigênio singlete. Experimento realizado em duplicata. 100 ng/μl foi utilizado como referência. * 0,01 < P < 0,05; *** P < 0,001.	39
Figura 10 - Luminescência por luciferase como medida de níveis de transcrição de células proficientes ou deficientes em NER, após tratamento de plasmídeo contendo gene repórter com 500 kJ/m ² de luz UVA. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em triplicata. *** P < 0,001.	40
Figura 11 - Modelo dos mecanismos de geração de lesões no DNA por luz UVA. Legenda: CPD: dímero de pirimidina ciclobutano; 6-4PP: fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona; DewarPP: fotoproducto isômero de Dewar; 8-oxodG: 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina; 5-HPMU: 5-(hidroperoximetil)uracila. Ver explicação do modelo no texto.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹O₂: oxigênio singlete (ou singleto)

6-4PP: fotoproduto pirimidina (6-4) pirimidona

8-oxodG: 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina

A, C, T, G: adenina, citosina, timina, guanina (respectivamente)

Anti-CPD: anticorpo primário específico para a lesão de DNA CPD

AVS: antraceno-9,10-divinilsulfonato

AVSO₂: endoperóxido do antraceno-9,10-divinilsulfonato

bp: pares de bases

CPD: dímeros de pirimidina *cis-syn*-ciclobutano

DewarPP: fotoproduto isômero de Dewar

D₂O: água deuterada (ou pesada)

DFO: deferoxamina (C₂₅H₄₈N₆O₈), também conhecida como desferal, desferroxamina, DFO-B, DFOA, DFB.

dG: desoxiguanosina

DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: ácido desoxirribonucleico

DSB: quebras duplas de DNA (*double strand breaks*)

dNTPs: 2'-desoxirribonucleotídeos-5'-trifosfatos

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs: espécies reativas de oxigênio

FCS: soro fetal bovino

Fpg: Formamidopirimidina-DNA glicosilase

Fpg-SS: sítios sensíveis à enzima Fpg

FI: DNA plasmidial superenovelado

FII: DNA plasmidial circular-relaxado

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

ISC: cruzamento intersistema (*intersystem crossing*)

kbp: quilopares de bases de DNA

NER: reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*)

OH[•]: radical hidroxila

PBS: tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

Lista de Abreviaturas e Siglas

PBST: tampão fosfato salino acrescentado de Tween 20 a 0,1%

sítios AP: sítios apurínicos-apirimidínicos (abásicos)

SSB: quebra de fita simples de DNA (*single strand break*)

T4-endo V: T4 endonuclease V

T4-endo V-SS: sítios sensíveis à enzima T4-endo V

TBE: tampão Tris (89 mM) - borato (89 mM) - EDTA (2 mM)

Tris: tris(hidroximetil)aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), também conhecido como THAM

UV: radiação ultravioleta

UVA: radiação ultravioleta A

UVB: radiação ultravioleta B

UVC: radiação ultravioleta C

XP: xeroderma pigmentosum

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 LUZ ULTRAVIOLETA A (UVA).....	16
1.2 DNA.....	16
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
1.3.1 Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)	18
1.3.2 Radical Hidroxila	19
1.4 LESÕES NO DNA POR AGENTES EXÓGENOS.....	19
1.4.1 Por absorção direta de fótons UVA.....	20
1.4.2 Mediadas por espécies reativas de oxigênio.....	20
1.5 COMPOSTOS UTILIZADOS	21
1.5.1 Azida de Sódio (NaN_3).....	21
1.5.2 Água deuterada (D_2O).....	22
1.5.3 Quelantes de metais	22
1.5.4 NaCl.....	22
1.5.5 DNA concentrado (1000 ng/μl)	22
1.5.6 AVS.....	23
1.6 IMPACTO BIOLÓGICO DAS LESÕES	23
1.6.1 Reativação pela célula hospedeira (HCR).....	23
2 OBJETIVOS.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 DOSÍMETRO BIOLÓGICO DE DNA	25
3.2 AMOSTRAS DE DNA.....	25
3.3 CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO.....	25
3.4 INCUBAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	26
3.5 AVALIAÇÃO DE LESÕES CPD E 8-oxodG POR ENSAIOS IMUNOLÓGICOS (<i>IMMUNO-SLOT-BLOT</i>).....	28
3.6 COMPOSTOS UTILIZADOS	29
3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	30
3.8 REATIVAÇÃO PELA CÉLULA HOSPEDEIRA (HCR).....	31
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS.....	33

4.1 DANOS DIRETOS AO DNA: ENSAIO COM DNA ISOLADO.....	33
4.1.1 Enzima T4-endonuclease V	33
4.1.2 Anticorpo anti-CPD	34
4.2 DANOS NO DNA POR ESTRESSE OXIDATIVO	35
4.2.1 Enzima Formamidopirimidina DNA glicosilase	35
4.2.2 Anticorpo anti-8-oxodG	37
4.2.3 HPLC para 8-oxodG	37
4.2.4 HPLC para AVSO ₂	38
4.2.5 HCR	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	51
ANEXO A - Biological sensors for solar ultraviolet radiation.....	52
ANEXO B - DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 LUZ ULTRAVIOLETA A (UVA)

De toda a radiação ultravioleta (UV) emitida pelo Sol que chega à superfície terrestre, mais de 95% corresponde à luz UVA (315 a 400 nm) (YAGURA et al., 2011). Os quase 5% restantes correspondem à UVB (280 a 315 nm), cuja incidência é proporcional, principalmente, à latitude (inversamente) e à altitude (diretamente), pois a atmosfera absorve grande parte de seus raios; ou seja, em baixas latitudes (próximo ao Equador) e em altas altitudes, a incidência de UVB é maior, porque a camada de ar que absorve a energia desses raios é menor. Raios UVC (100 a 280 nm) não chegam à superfície terrestre, pois a atmosfera (incluindo a camada de ozônio) é capaz de absorver toda a energia de comprimentos de onda correspondentes à UVC. Como a luz UVA praticamente não sofre essa absorção, ela chega à superfície quase que em sua totalidade (SCHUCH et al., 2012).

Apesar de ser benéfica para a saúde humana em alguns casos (PAVEL, 2006), a luz UVA também causa muitas injúrias e, embora não seja tão eficiente quanto a UVC e a UVB na produção de danos diretos na molécula de DNA, sua capacidade de gerar danos mediados por estresse oxidativo é uma característica marcante, sendo apontada como uma das causas de melanoma (PANICH et al., 2012).

1.2 DNA

O DNA, por ser uma molécula que carrega informação genética, é de extrema importância para a vida no planeta. Ele é um polímero composto por um esqueleto de fosfato e pentoses (desoxirriboses), às quais se ligam as nucleobases, quais sejam as purinas adenina (A) e guanina (G) e as pirimidinas timina (T) e citosina (C).

A dupla fita de DNA pode assumir três conformações distintas, a saber: A-DNA, B-DNA e Z-DNA. A forma B-DNA é a conformação mais comum, mas a forma Z-DNA também pode ser encontrada em organismos. Já a forma A-DNA ocorre em condições não fisiológicas de desidratação (GHOSH; BANSAL, 2003). Embora seja a mais comum, a forma B-DNA não é uma conformação bem definida, sendo na

realidade uma família de conformações relacionadas. São paracristais com significativo grau de desordem (BAIANU, 1980).

Os potenciais de redução das bases do DNA seguem a seguinte ordem:

$$T > C > A > G$$

o que faz da guanina a mais oxidável das bases (CRESPO-HERNÁNDEZ et al., 2007). De fato, ela é considerada um “tanque”, para onde cargas são transferidas, oxidando preferencialmente a guanina, e a eficiência dessa transferência de cargas é dependente de conteúdo GC (KAWAI; MAJIMA, 2011). A 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanina, embora seja um marcador de lesão por estresse oxidativo, é ainda mais oxidável que a guanina, o que ajuda a, uma vez formada, proteger as outras bases, embora essa oxidação extra seja fortemente dependente da natureza química do meio (AGNEZ-LIMA et al., 2012. In press.).

O DNA, embora seja relativamente estável, é alvo de constantes injúrias, tanto de origem endógena quanto exógena. Neste estudo, focaremos nas lesões geradas por luz UVA, que é uma fonte de origem exógena das mais abrangentes.

Monômeros do DNA, os nucleotídeos livres, são extremamente eficientes em dissipar energia de forma não radioativa (conversão interna). Quando ligados em fita, contudo, sofrem uma redução drástica dessa capacidade, formando excímeros de meia-vida incomparavelmente longa (MIDDLETON et al., 2009). Tais excímeros são dímeros excitados formados entre as bases do DNA, e sua meia-vida mais longa pode propiciar a ocorrência de reações.

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O metabolismo celular é responsável por grande parte do estresse oxidativo gerado endogenamente (BERRA et al., 2010). Entre as fontes exógenas, há uma miríade de noxae, tais como as provenientes da poluição, da nutrição e as radiações (SCHRÖDER; KRUTMANN, 2005), inclusive a luz visível (ZASTROW et al., 2009).

Dentre as várias espécies reativas existentes, as de oxigênio (EROs) têm um papel dos mais importantes como mediadores do estresse oxidativo em sistemas biológicos, e neste estudo focaremos nessa classe.

O oxigênio molecular (O_2), em seu estado fundamental, é um birradical. Ele é uma molécula diatômica peculiar na natureza, pois possui dois elétrons desemparelhados com spins paralelos, o que confere sua característica

paramagnética. Seu estado triplete o previne de reagir diretamente com muitas outras moléculas, que se encontram, normalmente, no estado singlete. Quando sofre cruzamento intersistema pelo mecanismo de fotossensibilização tipo II, entretanto, sua reatividade aumenta sobremaneira.

1.3.1 Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

A denominação “oxigênio singlete” admite dois estados eletronicamente excitados do $^1\text{O}_2$, que são o $^1\Delta_g$ (elétrons com spin invertido no mesmo orbital molecular) e o $^1\Sigma_g^+$ (elétrons com spin invertido em orbitais diferentes). O primeiro, embora menos energético, tem uma meia vida muito mais longa em relação ao último, o que lhe dá mais importância biológica, e por isso os termos “oxigênio singlete” e “ $^1\text{O}_2$ ” serão a ele referidos doravante.

Por causa da restrição por spin, o O_2 no estado fundamental é excitado a $^1\text{O}_2$ por absorção direta de radiação apenas em condições muito específicas (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1995). Quando gerado indiretamente por fotossensibilização (mecanismo tipo II), há a necessidade de um cromóforo que promova seu cruzamento intersistema (do estado triplete para o singlete), transferindo, inicialmente, energia para o oxigênio triplete (estado fundamental). Após o cruzamento intersistema, a mesma restrição por spin é responsável por manter o $^1\text{O}_2$ num estado metaestável, de forma que sua meia-vida é relativamente longa, permitindo a detecção de sua fosforescência em dois comprimentos de onda distintos (AGNEZ-LIMA et al., 2012. In press.).

Outras fontes de $^1\text{O}_2$ existentes são a partir de hidroperóxidos orgânicos na presença de íons metálicos ou HOCl (PRADO et al., 2009), por decomposição térmica de endoperóxidos, por processos enzimáticos de peroxidases e por oxidação e desproporcionamento de peróxido de hidrogênio (AGNEZ-LIMA et al., 2012. In press.).

O $^1\text{O}_2$ é um forte dienófilo, podendo reagir pelos mecanismos de cicloadição [4+2], cicloadição [2+2] e a reação ene (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

1.3.2 Radical Hidroxila

O radical hidroxila pode ser gerado na presença de íons metálicos e peróxido de hidrogênio, pela reação de Fenton; na ausência de metais, a radiação UV pode gerar radical hidroxila por fissão homolítica do peróxido de hidrogênio; radiação ionizante também é capaz de gerar esse radical a partir de água. Outras fontes são a partir do ozônio, do metabolismo de etanol e durante a decomposição de ácido peroxinitroso, entre outros.

Entre todos os radicais de oxigênio, o radical hidroxila é o mais reativo, reagindo no local em que é gerado, com praticamente qualquer molécula. Manitol muitas vezes é utilizado como suposto sequestrador desse radical; na realidade, sua constante de reação com o $\text{OH}^\bullet$ é igual ou até menor que a de muitas biomoléculas, de forma que é improvável que haja, *in vivo*, algum antioxidante que o sequestre preferencialmente.

Reações com $\text{OH}^\bullet$ podem ser classificadas em três tipos principais: abstração de hidrogênio, adição e transferência de elétrons. Em todos os casos, ao reagir com um não-radical, este radical produz outros radicais livres menos reativos em geral, dada sua extrema agressividade.

1.4 LESÕES NO DNA POR AGENTES EXÓGENOS

Muitas são as fontes danos ao DNA provindas do ambiente. Entre as principais, podem-se citar: radiação UV, radiação ionizante, altas temperaturas, mutágenos (substâncias químicas) e vírus. Neste trabalho, a radiação UV do tipo A será estudada.

A radiação UV é uma das fontes exógenas de danos ao DNA das mais abrangentes (SCHUCH; MENCK, 2010), e responsável pela grande incidência de câncer de pele no mundo.

Os efeitos celulares mais importantes induzidos pela radiação UV (morte celular e mutagênese) estão diretamente relacionados a uma cadeia de eventos que envolvem principalmente a indução de lesões no DNA. Não obstante, a natureza química e a eficiência na formação dessas lesões dependem muito do comprimento de onda dos fótons de UV incidentes (AGAR et al., 2004; SCHUCH et al., 2009). O máximo de absorção de luz por moléculas de DNA ocorre a 260 nm, ou seja, os

comprimentos de onda mais eficazes para a indução de fotoprodutos de DNA correspondem à UVC (100 - 280 nm), que, de fato, não atinge a superfície da Terra.

A luz UVA, mesmo sendo a que atinge em maior intensidade a superfície terrestre, é, de todo o espectro UV solar, a menos compreendida, havendo controvérsias até hoje quanto aos tipos de lesão que ela pode causar na molécula de DNA (BIVERSTÅL et al., 2008; JIANG et al., 2009; MIDDLETON et al., 2009).

1.4.1 Por absorção direta de fótons UVA

Os diferentes comprimentos de onda da luz UV induzem diferentes tipos de danos no DNA (SCHUCH; MENCK, 2010). A excitação direta dessa molécula pela luz UV solar (principalmente por comprimentos de onda UVB (280 - 315 nm)) resulta em conhecidas modificações que desencadeiam reações de dimerização entre pirimidinas adjacentes. Os principais produtos resultantes dessas reações fotoquímicas são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs) (AGAR et al., 2004). Além disso, ao promover irradiação adicional com comprimentos de onda de UVA (cerca de 320 nm), os isômeros normais de 6-4PP podem ser convertidos para os seus isômeros Dewar (PERDIZ et al., 2000; RUNGER, 2007).

1.4.2 Mediadas por espécies reativas de oxigênio

Além da indução direta de lesões no DNA, a radiação UV pode causar danos indiretamente, após a absorção de fótons por cromóforos, gerando, principalmente, espécies reativas de oxigênio.

Entre os danos gerados oxidativamente, a 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), apesar de gerada em pequena quantidade, é considerada uma lesão marcadora para estresse oxidativo (CADET et al., 2009). Esses danos, que são induzidos mais eficientemente com a luz UVA (315 – 400 nm) do que com a UVB, têm sido propostos como uma lesão pré-mutagênica na mutagênese induzida por luz UVA (CHANDOR et al., 2006; GODAR, 2005; KOZMIN et al., 2005; PIETTE; MERVILLE-LOUIS; DECUYPER, 1986; SCHUCH; MENCK, 2010). Outro tipo de lesão do DNA induzida por UV, embora bastante

ineficientemente, é a quebra simples de uma das fitas do DNA. Tem sido sugerido, contudo, que essa é provavelmente uma lesão inócua, com pouca participação na formação de mutações (AGAR et al., 2004; DAHLE et al., 2008).

Em irradiações com luz UVA, o $^1\text{O}_2$ é o maior responsável pela formação de 8-oxodG. Após absorver energia de um cromóforo e passar para o estado singlete pelo cruzamento intersistema, ele reage por um mecanismo de cicloadição [4 + 2] no anel imidazol da base guanina.

$^1\text{O}_2$ não gera apenas 8-oxodG; ele também pode gerar quebras simples (SSBs) e sítios abásicos (sítios AP) em baixas quantidades na dupla fita de DNA, mas o padrão de lesão por oxigênio singlete difere do de radical hidroxila: ele gera SSBs apenas nos resíduos de guanina, por oxidar o açúcar correspondente (EPE, 1991). Ele também causa cross-links com proteínas que se ligam ao DNA, o que serve como fonte de outras EROs.

8-oxodG também pode ser gerado por $\text{OH}^\bullet$, mas não de forma preferencial, tal como por $^1\text{O}_2$. $\text{OH}^\bullet$ gera danos de forma indiscriminada, e, se sua participação fosse maior na geração de lesões por luz UVA, a quantidade de danos do tipo SSBs e pirimidinas oxidadas teria que ser observada em maior quantidade, o que não ocorre de fato (CADET et al., 2009).

1.5 COMPOSTOS UTILIZADOS

1.5.1 Azida de Sódio (NaN_3)

A azida de sódio é um supressor (*quencher*) de $^1\text{O}_2$, absorvendo sua energia extra por um mecanismo físico, sem a formação de produtos. Quando há a formação de produtos (reação química), o supressor químico é, por vezes, chamado de sequestrador (*scavenger*), que é o caso do AVS (visto adiante). Quando NaN_3 inibe a formação de danos por estresse oxidativo, entretanto, isso serve como um indicativo do envolvimento de $^1\text{O}_2$, mas não como uma prova, já que a azida pode reagir também com $\text{OH}^\bullet$, formando o radical azida (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

1.5.2 Água deuterada (D_2O)

O D_2O , por ter a transferência de energia de excitação do oxigênio singlete dificultada em relação à água, aumenta a meia-vida deste para aproximadamente 62 μs , enquanto em H_2O sua meia-vida é de 3,8 μs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). Diferentemente da azida, cujo efeito não é específico para o oxigênio singlete, o efeito de D_2O o é.

1.5.3 Quelantes de metais

EDTA e Chelex 100 são quelantes de íons metálicos em geral, enquanto Desferal é um quelante de íons de ferro. Ao se quelarem os íons metálicos, pode-se analisar seu envolvimento na geração de danos por irradiação com luz UVA. Como visto anteriormente, íons de ferro e outros metais podem reagir com H_2O_2 , gerando $OH^\bullet$ pela reação de Fenton e Fenton-like, respectivamente. Também podem reagir com hidroperóxidos orgânicos (especialmente os de timina, no DNA), gerando 1O_2 (PRADO et al., 2009).

1.5.4 NaCl

Os grupamentos fosfato da molécula de DNA têm caráter negativo, conferindo carga negativa ao DNA como um todo. A adição de íons Na^+ na solução contendo DNA permite uma aproximação maior das moléculas de DNA, o que aumenta sua “blindagem” aos noxae. A essa aproximação, com diminuição da superfície de DNA exposta, denominaremos “compactação” neste trabalho, não significando, portanto, alteração na conformação estrutural da molécula (definida como formas A, B e Z).

1.5.5 DNA concentrado (1000 ng/ μl)

Utilizamos DNA numa concentração de 1000 ng/ μl (dez vezes maior que o controle de irradiação, de 100 ng/ μl) para verificar a influência da concentração sobre a geração de danos.

1.5.6 AVS

O AVS (antraceno-9,10-divinilsulfonato) é um dieno que serve de alvo para o $^1\text{O}_2$, que se adiciona segundo a reação de Diels-Alder, gerando o endoperóxido correspondente (AVSO₂), detectável por HPLC.

Apesar de também ser um fotossensibilizador, ele mesmo se auto-oxida subsequentemente à geração de $^1\text{O}_2$.

1.6 IMPACTO BIOLÓGICO DAS LESÕES

Embora CPDs sejam o tipo de lesão mais comum após irradiação com luz UVA, bases oxidadas têm tido destaque crescente, verificando-se seu envolvimento em patologias neurológicas, envelhecimento e melanoma (ALAM et al., 1997; MOURET; FORESTIER; DOUKI, 2012; NUNOMURA et al., 2001; OIKAWA, 2005).

1.6.1 Reativação pela célula hospedeira (HCR)

A técnica de reativação pela célula hospedeira (HCR, Host Cell Reactivation) consiste na transfecção de um gene repórter (em geral, da luciferase) em células, para se medir a capacidade de reparo destas. O plasmídeo contendo o gene repórter, após transfectado, é reparado pela maquinaria da célula hospedeira, de modo que, posteriormente, a luminescência observada seja uma medida indireta da capacidade de reparo da célula.

Em bactérias, reparo NER e BER podem ambos atuar nas lesões por $^1\text{O}_2$, sendo necessário um duplo deficiente para haver aumento de citotoxicidade (BOITEUX; HUISMAN, 1989; EPE, 1991).

Nesse contexto, pretende-se compreender a importância relativa de bases oxidadas em relação a CPDs na inibição da transcrição de células humanas. Um fato a ser considerado é que o reparo por excisão de bases oxidadas em DNA de fibroblastos de células humanas e células de melanoma que foram expostas a doses moderadas de radiação UVA é prejudicado, enquanto a remoção de CPDs gerados nas mesmas condições de irradiação não é afetado (CADET et al., 2009). No caso do HCR, esse efeito não será observável, uma vez que a célula hospedeira não é irradiada, apenas recebendo um plasmídeo que sofreu esse tratamento.

2 OBJETIVOS

Determinar os possíveis mecanismos de indução de lesões de DNA pela radiação UVA. Abaixo encontram listados os objetivos específicos do projeto:

Aplicação do sistema Dosímetro Biológico de DNA em irradiações de amostras de DNA com lâmpada de UVA, sob diferentes condições bioquímicas;

Comparar a eficiência de indução de lesões do tipo CPDs e bases oxidadas após a realização de exposições de amostras de DNA à luz UVA nessas diferentes condições.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DOSÍMETRO BIOLÓGICO DE DNA

A irradiação das amostras de DNA foi feita no sistema dosímetro biológico de DNA, construído com o Kit Elastomer Sylgard 184TM (Dow Corning, Midland, MI, EUA) (SCHUCH et al., 2009). Trata-se de um material altamente transparente à radiação UV, com orifícios que comportam aproximadamente 25 µl de solução com DNA. Após a adição das amostras, selam-se os orifícios com um adesivo apropriado. O dosímetro é então colocado com a abertura do orifício voltada para baixo, o que impede a evaporação das amostras. O líquido não escorre por causa do tamanho reduzido, que permite que a tensão superficial seja suficientemente forte.

3.2 AMOSTRAS DE DNA

O vetor plasmidial usado nas irradiações é o pCMUT, que tem 1762 bp, derivado do plasmídeo pAC189. Sua purificação é feita com kit Qiagen Plasmid Maxi (Valencia, CA, EUA), e estoque em Tampão TE (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA). Para o ensaio com HPLC, foi utilizado DNA de timo de bezerro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foi irradiado em placas de plástico de 35 mm de diâmetro (Nunc, Roskilde, Zealand, Dinamarca).

3.3 CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Para a irradiação com luz UVA utilizou-se a lâmpada Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W (espectro apresentado na figura abaixo) com um filtro de vidro Schott BG39 de 3 mm de espessura (Schott Glass, Mainz, Renânia-Palatinado, Alemanha). A medição de sua potência foi feita com o radiômetro de UV VLX 3W (Vilber Lourmat, Torcy, Île-de-France, França). Na sala onde a irradiação é realizada mantém-se ligado um condicionador de ar na temperatura mínima (18 °C), na maior potência. Para melhorar a circulação do ar, um ventilador apontado para as amostras sendo irradiadas é mantido em funcionamento, também na potência máxima. Um termômetro que registra temperaturas máxima e mínima é mantido ao lado das

amostras. A uma distância de aproximadamente 30 cm da lâmpada, ele registrou, sempre, temperaturas máximas abaixo de 40 °C.

Figura 1 - Espectro de emissão da lâmpada Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W. Espectro obtido por espectrorradiômetro HR4000 da Ocean Optics (Dunedin, FL, EUA). A temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram medidas por um termo-higrômetro LV12168/06, da Visomes (São Paulo, SP, Brasil), variando entre 21 °C a 22 °C e 60% a 70% (abaixo do filtro), respectivamente.

Fonte: (SCHUCH et al., 2009).

3.4 INCUBAÇÕES ENZIMÁTICAS

Para a detecção de CPDs e bases oxidadas realizamos experimentos com as respectivas enzimas. Os procedimentos envolvem incubação de 200 ng de DNA com: 0,8 U de Formamidopirimidina-DNA glicosilase (proteína Fpg, da New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) de *E. coli* a 37 °C por 60 minutos; e 70 ng de T4 endonuclease V (T4-endo V, produzida no laboratório) a 37 °C por 60 minutos. A formamidopirimidina-DNA-glicosilase (Fpg) é uma enzima de origem bacteriana (*E. coli*) que reconhece sítios com bases oxidadas e as cliva. Ela atua também como AP-liase (AP: sítio abásico, do inglês *apurinic/aprimidinic*), clivando a fita de DNA no local da lesão. Como exemplos de bases reconhecidas pela Fpg, pode-se citar as seguintes: 8-oxodG, 8-oxoadenina, fapy-guanina, metil-fapy-guanina, fapy-adenina, 5-hidroxi-citosina e 5-hidroxi-uracila (TCHOU et al., 1994). A T4-endo V, proveniente do bacteriófago T4, cliva o DNA especificamente em sítios com CPDs ou sítios AP (ela também é uma AP-liase). Para saber se as substâncias químicas interferiam na

ação das enzimas, foram feitos controles em que certa substância foi adicionada à solução com DNA apenas depois da irradiação, para então se proceder à reação enzimática. Assim, nos gráficos, os nomes de algumas substâncias estarão adicionados das palavras “antes” ou “depois”, indicando se a substância foi adicionada antes ou depois da irradiação, respectivamente. Esses controles são mais apropriados que precipitar o DNA das amostras, pois a precipitação resultaria em mais quebras, o que poderia distorcer os dados. Após separação por eletroforese em gel de agarose a 0,6% (essa concentração, embora baixa, se mostrou suficiente para permitir uma separação de bandas satisfatória), analisa-se a imagem por densitometria (Image Quant 300, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), obtendo-se dados de intensidade de fluorescência que são utilizados para se calcular o número de sítios sensíveis às enzimas por kbp (quilopares de bases) de DNA. Tal número (X) é uma distribuição de Poisson calculada por uma fórmula adaptada a esta técnica (DI MASCIO et al., 1990):

$$X = -\ln(1,4 \times FI \div (1,4 \times FI + FII)) \div 1,8$$

onde: FI representa a intensidade de fluorescência medida na banda de DNA superenovelado, FII representa a intensidade de fluorescência medida na banda de DNA circular relaxada e 1,4 é um fator aplicado para corrigir a fluorescência devido à maior capacidade de ligação do brometo de etídio a DNA na forma circular relaxada. A forma linear (FIII) não é observada nos controles, salvo nos casos em que se utiliza a enzima em concentrações extremamente elevadas.

Os dados gerados constituem ESS/kpb (*enzyme sensitive sites/kpb*) e são posteriormente convertidos e apresentados em porcentagem em relação ao controle positivo (irradiado), para facilitar a comparação da ação de cada substância. Há que se ressaltar que, nas condições utilizadas, os T4-endo V-SS (sítios sensíveis à enzima T4-endonuclease V) sempre apresentam níveis absolutos maiores que os Fpg-SS (sítios sensíveis à enzima Formamidopirimidina DNA glicosilase) no controle positivo. A consequência disso é que os níveis do controle negativo, embora em níveis absolutos semelhantes, sempre ficam maiores nos Fpg-SS, em medidas relativas. Para melhor visualização, veja a figura abaixo:

Figura 2 - Exemplo ilustrativo de gel de agarose com amostras incubadas com enzimas Fpg e T4-endo V, com as respectivas quantificações absoluta e relativa. A) Fotografia de gel; B) Quantidade absoluta de ESS/kbp; C) Quantidade relativa de ESS/kbp (em %).

3.5 AVALIAÇÃO DE LESÕES CPD E 8-oxodG POR ENSAIOS IMUNOLÓGICOS (IMMUNO-SLOT-BLOT)

Para a avaliação da formação de lesões CPD e 8-oxodG após exposições do Dosímetro de DNA a radiação UVA, amostras do vetor pCMUT obtidas após cada tratamento são misturadas com DNA de esperma de salmão (totalizando 1 µg de DNA), desnaturadas a 95 °C por 10 minutos e imediatamente colocadas no gelo. Esse DNA é transferido para membranas de nitrocelulose e estas são incubadas com 150 ml de SSC 5X (750 mM NaCl, 75 mM citrato de sódio) por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, a membrana é seca à temperatura ambiente e então incubada a 80 °C por 2 horas. Essa membrana é bloqueada em 5% leite diluído em PBS por 16 a 18 horas a 4 °C e incubada com os anticorpos primários anti-CPD (diluição 1:2.000, Medical and Biological Laboratories Co. Ltd, Nagoya, Aichi, Japão) ou anti-8-oxodG

(diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), por 3 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante. Ao final desse período, o anticorpo primário é removido e são executadas 6 lavagens (5 minutos cada) em PBST (0,1% Tween 20 em PBS) e uma em PBS. O anticorpo secundário (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) é adicionado na diluição de 1:2.000 e a membrana é incubada por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante. Novamente, após a remoção do anticorpo secundário, são executadas 6 lavagens em PBST e uma lavagem final em PBS. Por fim, é adicionado o reagente de quimioluminescência (Amersham ECL *Western blotting detection reagents and analysis system*, GE Healthcare), que gera um sinal luminoso pela oxidação desse reagente pela enzima HRP (*horseradish peroxidase*), que está conjugada ao anticorpo secundário. As membranas são analisadas pelo sistema detector de quimioluminescência (Image Quant 300, GE Healthcare).

3.6 COMPOSTOS UTILIZADOS

Em nosso trabalho, irradiamos o DNA com a finalidade de obter pistas sobre os mecanismos de lesão no DNA pela luz UVA. Para tanto, executamos a irradiação na presença de substâncias diversas ou nas condições abaixo listadas:

Azida de sódio (NaN_3) a 10 mM (Sigma-Aldrich): conhecido como potente supressor ("*quencher*") de oxigênio singlete; há estudos, contudo, que demonstram ter a azida um caráter menos específico, suprimindo, entre outros, também o radical hidroxila (DI MASCIO et al., 1990; RAVANAT; CADET, 1995; WEI et al., 1997).

D₂O (água deuterada/pesada) acima de 95% (Sigma-Aldrich): aumenta a meia-vida do oxigênio singlete, potencializando os danos gerados oxidativamente por essa molécula.

EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10 mM (Sigma-Aldrich): agente quelante, forma complexos estáveis com íons metálicos, reduzindo a formação de radicais hidroxila próximo ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

NaCl (cloreto de sódio) (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha): Jiang et al. (2009) já demonstraram que a solução em que o DNA se encontra diluído exerce grandes diferenças na indução de lesões, provavelmente por causa de alterações conformacionais na molécula de DNA, modulando sua susceptibilidade aos danos

(SONG et al., 2006). Pretendemos analisar a influência da concentração de NaCl na indução de lesões de forma mais detalhada e nas nossas condições.

Chelex 100 (Sigma-Aldrich): antes da irradiação, as amostras de DNA são tratadas com Chelex 100 por pelo menos uma hora sob agitação constante, ao fim da qual o Chelex 100 é removido. Avaliação de possível geração de espécies reativas por reações do tipo Fenton e/ou “Fenton-like”.

Deferoxamina a 0,1 mM (Sigma-Aldrich): avaliação de possível geração de espécies reativas por reações do tipo Fenton, com envolvimento de íons de ferro.

Concentração de DNA (Sigma-Aldrich): análise da influência da concentração de DNA sobre a geração de lesões.

3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Nos ensaios cromatográficos, foram utilizados os seguintes equipamentos: coluna de fase reversa Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), da Phenomenex (Torrance, CA, EUA); detectores de arranjos de fotodiodos (doravante denominados “detectores UV”) modelos SPD-M10AV ou SPD-M10Avp, da Shimadzu (Kyoto, Kyoto, Japão); detector multi-eletrodo (doravante denominado “detector eletroquímico”) Coulochem II, da ESA (Chelmsford, MA, EUA).

As amostras de DNA de timo de bezerro foram precipitadas (no caso da 8-oxodG) e hidrolisadas previamente da seguinte maneira: adiciona-se 1 unidade de nuclease P1 (Sigma-Aldrich) para cada 100 µg de DNA e 2 µl de tampão acetato de sódio a 3 M (pH 5) foram incubados por 30 min a 37 °C no escuro; em seguida, adicionou-se 2 µl de tampão Tris-HCl a 3 M (pH 7,4), 6 µl de tampão para fosfatase alcalina e 3 U de fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) para cada 100 µg de DNA e incubou-se por 1 h a 37 °C. O volume das amostras foi, então, ajustado para 100 µl com H₂O.

Para a detecção de 8-oxodG, foi utilizado o HPLC acoplado a detector eletroquímico. Na “guard-cell”, o potencial utilizado foi de 900 mV; na célula analítica, os potenciais dos eletrodos foram 130 mV e 280 mV. O eluente isocrático foi tampão fosfato de potássio a 25 mM, pH 5,5, metanol a 8%, num fluxo de 1 ml/min. A razão molar entre 8-oxodG e dG foi determinada com base na detecção coulométrica a 280 mV para 8-oxodG e absorbância a 254 nm para dG.

Para o estudo da geração de oxigênio singlete, foi utilizado o antraceno-9,10-divinilsulfonato (AVS), um captador de oxigênio singlete cujo produto de oxidação, o AVSO₂, foi quantificado por detector UV. A quantidade de endoperóxido formado foi calculada pela razão entre os picos (integrados) de AVSO₂ e AVS na absorbância a 210 nm do detector UV.

3.8 REATIVAÇÃO PELA CÉLULA HOSPEDEIRA (HCR)

Em nossos experimentos, utilizamos células MRC5 (fibroblastos de pulmão fetal humano), proficientes em reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e células XP12BE (fibroblastos humanos deficientes na proteína de reparo XPA), deficientes em NER, para comparar o impacto das lesões geradas pela luz UVA. As células foram plaqueadas numa placa de cultura de células opaca de 96 poços (20 mil células por poço) um dia antes da transfecção. Após tratamento do plasmídeo pShuttle/Luc (contendo o gene da luciferase de vagalume), 180 ng deste e 20 ng do plasmídeo (não irradiado) pShuttle/Renilla (contém o gene para luciferase de renilla, que emite luz num comprimento de onda diferente, para controle de transfecção), adicionados de DMEM para um volume de 25 µl, são reservados num microtubo. Num outro microtubo, 1,25 µl de lipofectamina é adicionado a 23,75 µl de DMEM. Após 5 min, os conteúdos são somados e misturados por agitação. Enquanto se espera 15 minutos, suga-se o meio de cultura das células, adicionando-se 50 µl de DMEM por poço. Após os quinze minutos, adicionam-se 50 µl da mistura de plasmídeos e lipofectamina em DMEM em cada poço. Espera-se por 2 a 4 h para se adicionar DMEM com soro fetal bovino a 20% mais antibiótico. Incuba-se por 48 horas, para então se sugar o meio de cultura e se adicionar 40 µl de DMEM sem “phenol red” e 40 µl de Dual-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI, EUA) à temperatura ambiente. Espera-se por 10 min para se obter os valores de luminescência da luciferase de vagalume por meio do luminômetro GloMax-Multi Microplate Multimode Reader (Promega). Após a leitura, adicionam-se 40 µl do mix para leitura de luciferase de renilla (Dual-Glo Stop and Glo Substrate e Dual-Glo Stop & Glo Buffer na proporção de 1:100). Após 10 min, faz-se a leitura dos valores de luminescência da luciferase de renilla. Por fim, normalizam-se os valores de luminescência da luciferase de vagalume pela de luciferase de renilla.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados, foram feitas análises de variâncias simples, com o programa GraphPad Prism. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. Testes de Tukey ou Dunnett foram realizados consecutivamente para se determinar diferenças significativas (CABRAL, 2008).

4 RESULTADOS

4.1 DANOS DIRETOS AO DNA: ENSAIO COM DNA ISOLADO

4.1.1 Enzima T4-endonuclease V

Após irradiar amostras de DNA com uma dose de 500 kJ/m² de luz UVA, foram realizados ensaios bioquímicos com o uso da enzima T4-endonuclease V, que revelou o número de sítios sensíveis à T4-endo V (T4-endo V-SS), ou seja, o número de CPDs.

Neste caso em especial, usamos condições que modificam a compactação do DNA e, consequentemente, sua capacidade de absorção e excitação pela luz UVA.

Figura 3 - Formação de T4-endo V-SS (CPDs) em DNA plasmidial após sua irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA na presença de NaCl ou DNA em alta concentração. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. A notação “depois” indica que a substância foi adicionada após a irradiação, mas antes da incubação enzimática. Experimento realizado em triplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001.

A figura acima mostra que:

- o NaCl, quando irradiado junto ao DNA, protege-o da indução de CPDs. Não há influência do NaCl sobre a T4-endo V, já que na amostra em que o NaCl foi adicionado após a irradiação (“NaCl depois”) a quantidade induzida de T4-endo V-SS em relação ao controle (“500 kJ/m² Tris-HCl”) não divergiu significativamente do controle;
- o próprio DNA, em maior concentração, sofre menos danos diretos (CPDs). Tomamos o cuidado de, após a irradiação, diluir a amostra “10 x [DNA]” para a concentração padrão de irradiação (100 ng/μl, medida com o uso do espectrofotômetro Nanodrop 1000, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), de modo a mantermos a mesma condição durante a incubação com T4-endo V.

4.1.2 Anticorpo anti-CPD

A seguir, confirmamos os resultados do experimento acima com outra técnica, o *immuno-slot blot*, por meio do uso do anticorpo anti-CPD.

Figura 4 - Detecção de CPDs por anticorpo específico após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em duplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. * 0,01 < P < 0,05; ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001.

Esses ensaios basicamente confirmam o ensaio enzimático, ressaltando-se a dificuldade de se compará-los quantitativamente, por serem técnicas diferentes. Em ambos, observou-se uma redução no nível de lesões na presença de NaCl e DNA em maior concentração.

4.2 DANOS NO DNA POR ESTRESSE OXIDATIVO

4.2.1 Enzima Formamidopirimidina DNA glicosilase

Passamos, então, à análise dos danos induzidos por estresse oxidativo gerado com a irradiação com luz UVA.

Figura 5 - Formação de sítios sensíveis a Fpg (Fpg-SS) após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. A notação “depois” indica que a substância foi adicionada após a irradiação, mas antes da incubação enzimática. Experimento realizado em triplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. *** P < 0,001.

Nesse ensaio com a enzima Fpg, um grande número (7) de compostos foi testada quanto à capacidade de influenciar a formação de bases oxidadas. Observamos que, em relação ao controle (500 kJ/m² Tris-HCl):

- NaN₃, um supressor de oxigênio singlete, foi capaz de reduzir o número de sítios sensíveis à Fpg (Fpg-SS), enquanto o D₂O, conhecido por aumentar a meia-vida do oxigênio singlete, aumentou a formação de bases oxidadas;
- EDTA, Chelex 100 e Desferal (deferroxamina), quelantes de íons metálicos, diminuíram a produção de danos por estresse oxidativo;
- NaCl também levou a uma diminuição desses danos indiretos.

Em nenhum desses casos, os efeitos desses compostos afetaram a atividade enzimática, como indicado pelos resultados na condição “depois”.

A fim de testar mais uma condição – DNA 10 vezes mais concentrado – foi feita nova irradiação, cujo resultado é apresentado abaixo.

Figura 6 - Formação de sítios sensíveis a Fpg (Fpg-SS) após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA alterando-se a concentração de DNA. Experimento realizado em triplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. ** 0,001 < P < 0,01

A figura acima mostra que mais DNA leva a maior indução de bases oxidadas, contrastando com seu efeito protetor contra CPDs.

4.2.2 Anticorpo anti-8-oxodG

Alguns desses dados foram confirmados com o uso do anticorpo anti-8-oxodG, que é um biomarcador específico de lesão, dentre as várias reconhecidas pela Fpg.

Figura 7 - Detecção de 8-oxodG com anti-8-oxodG após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA na presença de NaN₃ e NaCl. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em duplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001.

O *immuno-slot-blot* contra 8-oxodG confirmou que NaN₃ e NaCl diminuem a indução dessas lesões, comparado ao controle.

4.2.3 HPLC para 8-oxodG

Em sequência, por meio de um ensaio mais específico, a detecção eletroquímica de 8-oxodG (HPLC-ED), procuramos quantificar novamente os dados relacionados aos danos induzidos por espécies reativas de O₂ geradas pela luz UVA.

Figura 8 - Detecção de lesões 8-oxodG por HPLC acoplado a detector eletroquímico após irradiação com 500 kJ/m² de luz UVA nas condições indicadas na figura. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em duplicata. Ref.: referência (controle positivo) para comparações com o restante das amostras. * 0,01 < P < 0,05; ** 0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001; ns: não significativo.

O HPLC acoplado a detector eletroquímico (HPLC-ED) basicamente confirmou a maioria dos dados obtidos anteriormente, indicando que, em DNA irradiado com luz UVA, há redução de bases oxidadas na presença de NaN₃, EDTA, desferal e alta concentração de NaCl. Quando a irradiação é feita na presença de D₂O ou em alta concentração de DNA, o nível de bases 8-oxodG aumenta.

4.2.4 HPLC para AVSO₂

Os dados acima apontam para uma participação de oxigênio singlete como intermediário na formação de lesões oxidadas por luz UVA. Para se testar essa hipótese, realizamos experimentos com a irradiação com luz UVA na presença de AVS, um captador de oxigênio singlete que pode ser detectado e quantificado por HPLC acoplado a detector UV. A irradiação foi feita em concentrações crescentes de DNA.

Figura 9 - Detecção de AVSO₂ (medida indireta de formação de oxigênio singlete) por HPLC acoplado a detector UV após irradiação de concentrações crescentes de DNA com 500 kJ/m² de luz UVA. O AVSO₂ corresponde ao AVS em sua forma oxidada por oxigênio singlete. Experimento realizado em duplicata. 100 ng/μl foi utilizado como referência. * 0,01 < P < 0,05; *** P < 0,001.

Os dados acima confirmam que maiores concentrações de DNA levam a uma maior geração de oxigênio singlete, pois há mais AVSO₂ (captador oxidado por oxigênio singlete) gerado. Assim, além de demonstrar a formação de oxigênio singlete nessas condições, o DNA aparece como a molécula intermediária, necessária para a formação de ¹O₂.

4.2.5 HCR

Para verificar a relevância biológica das lesões por luz UVA no DNA, utilizamos a técnica de reativação pela célula hospedeira (HCR). Nela, um plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase foi irradiado com 500 kJ/m² de luz UVA e depois transfectado em linhagens celulares proficientes (MRC5) ou deficientes (XP12BE) em reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Após 2 dias, os níveis de expressão de luciferase (luminescência relativa) foram medidos.

Figura 10 - Luminescência por luciferase como medida de níveis de transcrição de células proficientes ou deficientes em NER, após tratamento de plasmídeo contendo gene repórter com 500 kJ/m² de luz UVA. As condições em que o DNA foi irradiado estão indicadas em cada barra da figura. Experimento realizado em triplicata. *** P < 0,001.

A linhagem proficiente em NER (MRC5) foi capaz de restaurar os níveis de expressão de luciferase para o mesmo nível do controle não irradiado de todas as amostras irradiadas, com exceção do controle positivo (irradiado). O mesmo não ocorreu com a linhagem deficiente (no gene XPA), que restaurou os níveis de expressão apenas nas amostras “1 M NaCl” e “10 x [DNA]”.

5 DISCUSSÃO

Até hoje, os mecanismos pelos quais a luz UVA gera danos no DNA permanecem incertos. Há grupos que afirmam que a geração de fotoprodutos por luz UVA é mediada por cromóforos (CADET et al., 2009), enquanto outros propõem que o DNA é ineficiente mas significativamente capaz de absorver energia dessa radiação (JIANG et al., 2009; SAGE; GIRARD; FRANCESCONI, 2012; SUTHERLAND; GRIFFIN, 1981). Nosso grupo obteve dados que também apontam para um mecanismo direto de absorção, inclusive com a formação de 6-4PPs, fotoprodutos tidos como marcadores para absorção direta (SCHUCH et al., 2009).

Com relação aos danos por estresse oxidativo, a maioria dos estudos é feita com culturas de células. Sabe-se que, no meio intracelular, há uma miríade de cromóforos, tais como citocromos, hemoglobina e mioglobina, capazes de participar de reações de fotossensibilização, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), além de outros produtos e intermediários. Também há EROs de origem endógena, provenientes do metabolismo normal de oxigênio. Tais espécies, inclusive, têm funções na sinalização celular (AGNEZ-LIMA et al., 2012. In press.). Essa pluralidade de possíveis fontes de EROs dificulta ou mascara a identificação de uma origem específica de espécies reativas para as lesões de DNA. Nesse sentido, o dosímetro de DNA (SCHUCH et al., 2009) apresenta a vantagem de ser um sistema *in vitro* simples, com a possibilidade de controle maior sobre as condições de irradiação, o que permite estudar vários parâmetros para responder a questões mecanísticas da geração de danos por luz UVA.

Neste trabalho, as buscas por mecanismos diretos de absorção de luz UVA pelo DNA centraram-se na análise do fotoproduto CPD. Verificou-se que o DNA, quando em maior concentração, pode servir como um “escudo” para suas moléculas menos expostas, fazendo-lhes “sombra”, o que faz com que elas sofram menos a ação direta da radiação, diminuindo o número de CPDs induzidos. Isso pôde ser observado tanto no ensaio enzimático quanto no imunológico. O aumento da concentração de NaCl na solução, quando da irradiação do plasmídeo, também reduz a quantidade de CPDs produzidos. Sabe-se que os cátions de sódio permitem uma maior aproximação dos grupos fosfato do esqueleto do DNA, que têm carga negativa. Assim, tais cátions contribuem para uma maior compactação da

molécula de DNA, diminuindo sua superfície de exposição à luz UVA, o que explica a menor quantidade de CPDs produzidos e corrobora para a ideia da necessidade de absorção de energia de maneira direta pelo DNA, para a geração de fotoprodutos. Dados e conclusões similares foram encontrados por outros grupos, incluindo pela redução de CPDs em moléculas irradiadas na presença de NaCl (JIANG et al., 2009) e indicação de absorção de energia da luz pela molécula de DNA para formação desses fotoprodutos (DOUKI et al., 1999).

Mudando o foco para danos por estresse oxidativo, verificou-se a modulação da indução de bases oxidadas por NaN_3 e D_2O , supressor e potenciador dos efeitos do oxigênio singlete, respectivamente, indicando o envolvimento dessa molécula excitada na formação de bases oxidadas (principalmente 8-oxodG) em DNA irradiado com luz UVA. NaN_3 , isoladamente, não é específico para $^1\text{O}_2$, já que também pode suprimir outras espécies reativas, tais como o radical hidroxila. D_2O , entretanto, atua de forma específica sobre $^1\text{O}_2$, aumentando a meia-vida dessa espécie reativa (PRADO et al., 2009). Portanto, a combinação desses efeitos (diminuição de danos por NaN_3 e aumento de danos por D_2O) permite concluir-se que $^1\text{O}_2$ está envolvido no estresse oxidativo gerado por luz UVA. De fato, a formação de $^1\text{O}_2$ nas moléculas de DNA irradiadas com luz UVA foi confirmada em experimentos com AVSO_2 (endoperóxido captador específico de $^1\text{O}_2$, (PRADO et al., 2009)). Esses experimentos demonstraram ainda que a formação de $^1\text{O}_2$ é dependente da molécula de DNA, o que é muito intrigante.

Embora haja evidências de geração direta de oxigênio singlete sem a necessidade de um fotossensibilizador, isso só é possível em condições especiais (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1995). Assim, na maioria dos casos, uma premissa consagrada para a geração de $^1\text{O}_2$ é a presença de um cromóforo que promova uma reação de fotossensibilização do tipo II, em que o cromóforo passa do estado triplete (excitado) para o singlete (estado fundamental da maioria dos compostos, sendo a molécula de oxigênio uma exceção a essa generalização) e o oxigênio passa do estado triplete (fundamental) para o singlete (excitado) (SCHWEITZER; SCHMIDT, 2003).

Uma de nossas amostras de DNA utilizadas para irradiação, o plasmídeo pCMUT, foi obtido por kits de purificação da Qiagen. Apesar do alto grau de pureza proporcionado pelo kit, pode-se suspeitar que componentes das células bacterianas

de onde os plasmídeos foram extraídos poderiam estar presentes em quantidades mínimas, mas significativas o suficiente para atuarem como fotossensibilizadores que permitam a formação de $^1\text{O}_2$. Outra amostra comercial de DNA de pureza superior, entretanto, também foi utilizada em ensaios para avaliação de danos por estresse oxidativo, e os resultados não divergiram dos obtidos com o plasmídeo. Verificamos que uma maior concentração de DNA aumenta o número de sítios oxidados na molécula de DNA (sítios sensíveis a Fpg e mesmo 8-oxodG, determinado por HPLC). Esses dados apontam para um possível mecanismo intrínseco de fotossensibilização, em que a própria molécula de DNA estaria atuando como geradora e alvo de $^1\text{O}_2$.

Deve-se considerar também, embora em quantidades ínfimas, a presença de impurezas. Dentre elas, os metais são os melhores candidatos, já que o DNA possui sítios para a ligação de seus íons (EICHHORN; BUTZOW; SHIN, 1985). Isso pôde ser averiguado com quelantes de metais, tais como EDTA, desferal e Chelex 100, que reduziram as quantidades de bases oxidadas após irradiação com luz UVA. Isso sugere que pode haver reações de Fenton (ou Fenton-like) ocorrendo durante a irradiação, mas isso requeriria a presença de H_2O_2 . Isso parece improvável, pois nosso sistema é isolado, onde não há uma fonte identificada desse peróxido. Além disso, nossos resultados empregando catalase em experimentos similares não reduziram a produção de bases oxidadas por irradiação com luz UVA (resultados não mostrados). Um estudo recente identificou hidroperóxidos de base como possíveis mediadores da geração de $^1\text{O}_2$, em conjunto com metais (PRADO et al., 2009). Assim, os metais contaminantes também parecem contribuir para a geração de oxigênio singlete, pelo mecanismo de Russel, diferentemente dos mecanismos de fotossensibilização. Ainda assim, para a geração dos hidroperóxidos de base, é necessário um fotossensibilizador, o que corrobora com nossa ideia de que o próprio DNA pode ter esse papel.

Os monômeros do DNA são, isoladamente, excelentes dissipadores de energia, mas quando polimerizados, essa dissipação fica dificultada, e o DNA fica num estado excitado por mais tempo. Apesar disso, o DNA requer uma conformação ótima para a geração de dímeros de timina (MIDDLETON et al., 2009). Isso pode ajudar a explicar alguns dos resultados que obtivemos. Mesmo sendo bons dissipadores de energia, purinas e pirimidinas no estado triplete são capazes de

gerar $^1\text{O}_2$, e o DNA é um cromóforo para luz UVA na região de comprimentos de onda de aproximadamente 360 nm, o que reforça nosso modelo proposto (BISHOP et al., 1994; RAVANAT; DOUKI; CADET, 2001). Assim, uma das perspectivas é a de que, mesmo com dNTPs isolados, o efeito observado no ensaio com AVS se repita. Ou seja, espera-se que, quanto maior a concentração de dNTPs irradiada com luz UVA, maior a quantidade de oxigênio singlete formado, medido pela quantidade de AVSO₂ (endoperóxido do AVS, captador específico para $^1\text{O}_2$).

Futuros estudos deverão abordar a detecção de peróxido de hidrogênio e/ou hidroperóxidos (STEENKEN et al., 2000) e como estes são gerados pela irradiação com luz UVA. Uma abordagem interessante é o ensaio FOX. Mais simples e mais rápido do que a espectrometria de massa, esse ensaio também possibilita a identificação desses peróxidos (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991; NOUROOZ-ZADEH; TAJADDINI-SARMADI; WOLFF, 1994). De qualquer forma, os dados indicam que a irradiação de moléculas de DNA com luz UVA forma bases oxidadas, através de $^1\text{O}_2$ gerado intrinsecamente. Estes dados são surpreendentes em si, mas também podem ter implicações interessantes para explicar a formação dessas lesões *in vivo*. De fato, a extrapolação desses dados para ambientes mais complexos, como na célula, sugere que não há necessidade de cromóforos intermediários para a formação de $^1\text{O}_2$ por luz UVA. A irradiação do genoma celular pode gerar, próximo à molécula de DNA, moléculas de $^1\text{O}_2$. Essa proximidade pode facilitar a reação de $^1\text{O}_2$ com as bases do DNA, levando à sua oxidação.

Em todos os casos – tanto para danos diretos quanto para danos indiretos – uma conformação do DNA mais compacta leva a uma menor indução de lesões – seja por expor menos as bases nitrogenadas à luz, seja por possivelmente diminuir a acessibilidade dos sítios passíveis de oxidação, necessários para a injúria por espécies reativas de oxigênio, respectivamente, sendo esse efeito observado pelo aumento da concentração de íons Na⁺.

Além de estudar mecanismos de ação de luz UVA na formação de lesões, também realizamos experimentos iniciais de busca das consequências biológicas dessas lesões, através de medidas de HCR, que indicam a inibição de transcrição de um gene repórter pela presença de lesões no DNA plasmidial irradiado com luz UVA. A análise dos resultados indica que as únicas amostras que levaram a níveis de expressão de luciferase nos mesmos patamares da amostra não irradiada, nas

duas linhagens celulares, foram “1 M NaCl” e “10 x [DNA]”, que, como visto nos ensaios anteriores, são eficazes em prevenir CPDs. Esses dados são muito claros, sobretudo para células XP12BE, deficientes no reparo de fotoprodutos (CPD e 6-4PP) no DNA. Assim, os dados correlacionaram muito bem com a redução de CPDs na molécula do DNA nessas condições. Lembramos ainda que, na irradiação com luz UVA de altas concentrações de DNA, houve um aumento de bases oxidadas, não correlacionada com a redução do bloqueio de expressão de luciferase. Sendo assim, os dados com HCR indicam fortemente que as lesões tipo CPD são mais relevantes do que bases oxidadas na inibição de expressão de luciferase por irradiação UVA. É importante chamar a atenção para o fato de que células XP12BE ainda apresentam reparo do tipo BER, o que pode também auxiliar na remoção de lesões como bases oxidadas. Assim, em células deficientes em NER, de fato, os CPDs e poucas lesões são os responsáveis por bloquear a transcrição celular.

Figura 11 - Modelo dos mecanismos de geração de lesões no DNA por luz UVA. Legenda: CPD: dímero de pirimidina ciclobutano; 6-4PP: fotoproduto pirimidina (6-4) pirimidona; DewarPP: fotoproduto isômero de Dewar; 8-oxodG: 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina; 5-HPMU: 5-(hidroperoximetil)uracila. Ver explicação do modelo no texto.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo, conseguimos obter resultados interessantes que revelam como ocorre a formação de lesões em moléculas de DNA irradiadas com luz UVA. Na figura anterior, apresentamos um modelo que auxilia a compreender as principais hipóteses levantadas pela interpretação desses dados. Assim, a absorção direta da radiação pelas bases do DNA deve ser o principal mecanismo para formação de dímeros de pirimidina, como CPD (este trabalho) e 6-4PP (SCHUCH et al., 2009). Lesões tipo DewarPP, isômeros de 6-4PP, também foram detectados em nosso laboratório (mesmo que em outras condições, CORTAT e MENCK, comunicação pessoal) e, de fato, esse tipo de lesão pode ser formado por irradiação com luz UVA através de modificação de 6-4PP. Por outro lado, bases oxidadas são formadas no DNA de modo indireto, ou seja, principalmente através da geração de $^1\text{O}_2$, que promove a oxidação das bases. Propomos que a produção de $^1\text{O}_2$ pode ocorrer por duas vias independentes:

1. Através das bases nitrogenadas, na molécula de DNA, atuando como cromóforos, produzindo $^1\text{O}_2$ pelas reações do tipo 2. Nesse caso, nossos dados não permitem excluir a participação de contaminantes residuais da molécula de DNA, ou mesmo metais nesse processo.
2. Por outro lado, a irradiação com luz UVA pode também levar à formação de endoperóxidos nas bases (como descrito para 5-HPMU). A decomposição de endoperóxidos na presença de metais pode gerar $^1\text{O}_2$.

Nos dois casos, o $^1\text{O}_2$ aparece como intermediário responsável pela formação de bases oxidadas no DNA.

Desenvolvemos também estudos através de ensaios HCR, que indicaram que, em plasmídeos irradiados com luz UVA, fotoprodutos, como CPDs, apresentam efeitos biológicos (inibição de expressão gênica) mais efetivos do que bases oxidadas, pelo menos em células XPA, deficientes em NER.

Estes estudos indicam o potencial de sistemas simples, no qual moléculas de DNA são irradiadas diretamente, podendo contribuir para o conhecimento da ação de luz UVA em material genético. Obviamente, esses dados podem ter implicações interessantes na compreensão de como luz solar pode atuar no genoma de células da pele.

REFERÊNCIAS

- AGAR, N. S. et al. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.101, n.14, p.4954-4959, 2004.
- AGNEZ-LIMA, L. F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.**, 2012. In press.
- ALAM, Z. I. et al. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: An apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. **J. Neurochem.**, v.69, n.3, p.1196-1203, 1997.
- BAIANU, I. Structural order and partial disorder in biological systems. **Bull. Math. Biol.**, v.42, n.1, p.137-141, 1980.
- BERRA, C. M. et al. Plasmid DNA damage induced by singlet molecular oxygen released from the naphthalene endoperoxide DHPNO2 and photoactivated methylene blue. **Quim. Nova**, v.33, n.2, p.279-283, 2010.
- BISHOP, S. M. et al. Singlet oxygen sensitisation by excited state DNA. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, n.7, p.871-872, 1994.
- BIVERSTÅL, A. et al. Cyclobutane pyrimidine dimers do not fully explain the mutagenicity induced by UVA in chinese hamster cells. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v.648, n.1-2, p.32-39, 2008.
- BOITEUX, S.; HUISMAN, O. Isolation of a formamidopyrimidine-DNA glycosylase (fpg) mutant of Escherichia coli K12. **Mol. Gen. Genet.**, v.215, n.2, p.300-305, 1989.
- CABRAL, H. J. Multiple comparisons procedures. **Circulation**, v.117, n.5, p.698-701, 2008.
- CADET, J. et al. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.8, n.7, p.903-911, 2009.
- CHANDOR, A. et al. Dinucleotide spore photoproduct, a minimal substrate of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from bacillus subtilis. **J. Biol. Chem.**, v.281, n.37, p.26922-26931, 2006.
- CRESPO-HERNÁNDEZ, C. E. et al. Determination of redox potentials for the watson-crick base pairs, DNA nucleosides, and relevant nucleoside analogues. **J. Phys. Chem. B**, v.111, n.19, p.5386-5395, 2007.
- DAHLE, J. et al. Overexpression of human ogg1 in mammalian cells decreases ultraviolet a induced mutagenesis. **Cancer Lett.**, v.267, n.1, p.18-25, 2008.

DI MASCO, P. et al. Singlet molecular-oxygen induced mutagenicity in a mammalian sv40-based shuttle vector. **Photochem. Photobiol.**, v.51, n.3, p.293-298, 1990.

DOUKI, T. et al. Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: Biological role†. **Photochem. Photobiol.**, v.70, n.2, p.184-190, 1999.

EICHHORN, G.; BUTZOW, J.; SHIN, Y. Some effects of metal ions on DNA structure and genetic information transfer. **J. Biosci.**, v.8, n.3, p.527-535, 1985.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chem.-Biol. Interact.**, v.80, n.3, p.239-260, 1991.

GHOSH, A.; BANSAL, M. A glossary of DNA structures from a to z. **Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.**, v.59, n.4, p.620-626, 2003.

GODAR, D. E. UV doses worldwide. **Photochem. Photobiol.**, v.81, n.4, p.736-749, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Clarendon Press, 1985. 346 p.

JIANG, Y. et al. UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. **Biophys. J.**, v.96, n.3, p.1151-1158, 2009.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the tba assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26, n.10, p.853-856, 1991.

KAWAI, K.; MAJIMA, T. G-C content independent long-range charge transfer through DNA electronic and magnetic properties of chiral molecules and supramolecular architectures. In: NAAMAN, R., BERATAN, D. N., et al (Ed.). **Electronic and magnetic properties of chiral molecules and supramolecular architectures**. Heidelberg: Springer Berlin, v.298, 2011. p.129-142. (Topics in current chemistry)

KOZMIN, S. et al. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.102, n.38, p.13538-13543, 2005.

MIDDLETON, C. T. et al. DNA excited-state dynamics: From single bases to the double helix. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v.60, p.217-239, 2009.

MOURET, S.; FORESTIER, A.; DOUKI, T. The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.11, n.1, p.155-162, 2012.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Anal. Biochem.**, v.220, n.2, p.403-409, 1994.

NUNOMURA, A. et al. Oxidative damage is the earliest event in alzheimer disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.60, n.8, p.759-767, 2001.

OIKAWA, S. Sequence-specific DNA damage by reactive oxygen species: Implications for carcinogenesis and aging. **Environ. Health Prevent. Med.**, v.10, n.2, p.65-71, 2005.

PANICH, U. et al. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: the protective effect of gallic acid. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.108, p.16-22, 2012.

PAVEL, S. Light therapy (with UVA-1) for SLE patients: Is it a good or bad idea? **Rheumatology**, v.45, n.6, p.653-655, 2006.

PERDIZ, D. et al. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of dewar photoproducts in solar mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.35, p.26732-26742, 2000.

PIETTE, J.; MERVILLE-LOUIS, M. P.; DECUYPER, J. Damages induced in nucleic acids by photosensitization. **Photochem. Photobiol.**, v.44, n.6, p.793-802, 1986.

PRADO, F. M. et al. Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet molecular oxygen in DNA. **Free Radical Biol. Med.**, v.47, n.4, p.401-409, 2009.

RAVANAT, J.-L.; DOUKI, T.; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.63, n.1-3, p.88-102, 2001.

RAVANAT, J. L.; CADET, J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. **Chem. Res. Toxicol.**, v.8, n.3, p.379-388, 1995.

RUNGER, T. M. How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: The role of cellular damage responses. **J. Invest. Dermatol.**, v.127, n.9, p.2103-2105, 2007.

SAGE, E.; GIRARD, P. M.; FRANCESCONI, S. Unravelling UVA-induced mutagenesis. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.11, n.1, p.74-80, 2012.

SCHRÖDER, P.; KRUTMANN, J. Environmental oxidative stress – environmental sources of ROS reactions, processes. In: GRUNE, T. (Ed.). **Oxidants and antioxidant defense systems**. Heidelberg: Springer Berlin, v.20, 2005. p.645-820. (The handbook of environmental chemistry)

SCHUCH, A. P. et al. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.8, n.1, p.111-120, 2009.

SCHUCH, A. P.; MENCK, C. F. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.99, n.3, p.111-116, 2010.

SCHUCH, A. P. et al. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.53, n.3, p.198-206, 2012.

SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. **Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)**, v.103, n.5, p.1685-1758, 2003.

SONG, C. et al. The effect of salt concentration on DNA conformation transition: A molecular-dynamics study. **J. Mol. Model.**, v.12, n.3, p.249-254, 2006.

STEENKEN, S. et al. The trap depth (in DNA) of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as derived from electron-transfer equilibria in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.**, v.122, n.10, p.2373-2374, 2000.

SUTHERLAND, J. C.; GRIFFIN, K. P. Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm. **Radiat. Res.**, v.86, n.3, p.399-410, 1981.

TCHOU, J. et al. Substrate specificity of fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.21, p.15318-15324, 1994.

WEI, H. et al. Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA. **Free Radical Biol. Med.**, v.23, n.1, p.148-154, 1997.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. **J. Phys. Chem. Ref. Data**, v.24, n.2, p.663-677, 1995.

YAGURA, T. et al. Biological sensors for solar ultraviolet radiation. **Sensors**, v.11, n.4, p.4277-4294, 2011.

ZASTROW, L. et al. The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v.22, n.1, p.31-44, 2009.

ANEXOS

- Artigo 1 YAGURA, T.; MAKITA, K.; YAMAMOTO, H.; MENCK, C. F.; SCHUCH, A. P. Biological sensors for solar ultraviolet radiation. **Sensors**, v.11, n.4, p.4277-4294, 2011.
- Artigo 2 SCHUCH, A. P.; YAGURA, T.; MAKITA, K.; YAMAMOTO, H.; SCHUCH, N. J.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MACMAHON, R. M.; MENCK, C. F. M. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.53, n.3, p.198-206, 2012.

Review

Biological Sensors for Solar Ultraviolet Radiation

Teiti Yagura¹, Kazuo Makita², Hiromasa Yamamoto³, Carlos F.M. Menck^{1,*} and André P. Schuch¹

¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; E-Mails: teiti.yagura@usp.br (T.Y.); aschuch@usp.br (A.P.S.)

² Faculty of Engineering, Takushoku University, Tokyo 193-0985, Japan; E-Mail: kmakita@la.takushoku-u.ac.jp

³ Department of Physics, Rikkyo University, Tokyo 171-8501, Japan; E-Mail: yamamoto@rikkyo.ac.jp

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: cfmmenck@usp.br; Tel.: +55-11-3091-7499; Fax: +55-11-3091-7354.

Received: 12 February 2011; in revised form: 2 April 2011 / Accepted: 4 April 2011 /

Published: 12 April 2011

Abstract: Solar ultraviolet (UV) radiation is widely known as a genotoxic environmental agent that affects Earth ecosystems and the human population. As a primary consequence of the stratospheric ozone layer depletion observed over the last decades, the increasing UV incidence levels have heightened the concern regarding deleterious consequences affecting both the biosphere and humans, thereby leading to an increase in scientific efforts to understand the role of sunlight in the induction of DNA damage, mutagenesis, and cell death. In fact, the various UV-wavelengths evoke characteristic biological impacts that greatly depend on light absorption of biomolecules, especially DNA, in living organisms, thereby justifying the increasing importance of developing biological sensors for monitoring the harmful impact of solar UV radiation under various environmental conditions. In this review, several types of biosensors proposed for laboratory and field application, that measure the biological effects of the UV component of sunlight, are described. Basically, the applicability of sensors based on DNA, bacteria or even mammalian cells are presented and compared. Data are also presented showing that on using DNA-based sensors, the various types of damage produced differ when this molecule is exposed in either an aqueous buffer or a dry solution. Apart from the data thus generated, the development of novel biosensors could help in evaluating the biological

effects of sunlight on the environment. They also emerge as alternative tools for using live animals in the search for protective sunscreen products.

Keywords: sunlight; UV radiation; biosensors; biological dosimetry; DNA damage

1. The UV Component of Sunlight

Ultraviolet (UV) radiation is part of the solar electromagnetic spectrum, with wavelengths shorter than those of visible light, but longer than X-rays. It is an essential factor for many global biological and environmental phenomena. There are three major subtypes of UV rays, namely, UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) and UVC (100–280 nm).

UVA accounts for about 95% of the total UV energy that reaches the Earth's surface, the remaining 5% being UVB. Seeing that the shorter the wavelength, the greater the absorption by the atmosphere, UVC, being totally absorbed by stratospheric gases, mainly oxygen and ozone, fails to reach the troposphere. Furthermore, since UVB is very effectively screened out by ozone molecules, only a small fraction actually reaches the surface, contrary to most of UVA. In the face of global efforts to diminish ozone-depleting substances, it can be said that, given the recent measures of increasing ozone levels worldwide [1], the Montreal Protocol on Substances That Deplete the Ozone Layer is really working.

Figure 1. Year-round (2009) solar UVA (blue) and UVB (red) doses measured in São Paulo—SP (23 °32'S, 46 °38'W), Brazil.

* Periods in which the measurements were not performed, due to technical reasons.

Furthermore, apart from the ozone-depleting gases policy, continuous efforts are under way to monitor the yearly incidence of surface UV radiation. Our research group has been dedicating special attention to the measurement of solar-UV rays in the city of São Paulo (23 °32'S; 46 °38'W), the largest in Brazil, and one of the most populous in the World. The incidence of solar UVB and UVA radiation has been measured throughout the day, over the last two years. In the year-round graph presented in

Figure 1, the winter (June to August) reduction in UV levels (although lower than in higher latitudes) is more pronounced in UVB daily doses, mainly due to the solar-angle effect at this latitude, as UVB is more absorbed by the atmospheric air mass, whereas UVA practically freely passes through.

Data of UVA and UVB doses for an entire day, at different latitudes in Brazil are presented in Figure 2 for comparison. The results show that the daily flow of UVA, besides being remarkably greater than UVB, is comparably more constant and detectable earlier in the day. Nevertheless, and as expected, at a lower latitude (Natal) UVB incidence is higher and can be detected earlier in the morning (around 6:00 a.m.), when compared to the other mid-latitudes (around 7:00 a.m.).

Ozone concentration, although important, is not the only factor exerting an influence on the incidence of UV radiation. The solar zenith angle, which varies according to the time of day, day of the year and latitude, also contributes enormously.

Figure 2. Solar UVA (blue) and UVB (red) irradiation profiles at (a) São Martinho da Serra—RS ($29^{\circ}44'S$, $53^{\circ}82'W$), (b) São Paulo—SP ($23^{\circ}32'S$, $46^{\circ}38'W$), and (c) Natal—RN ($5^{\circ}47'S$, $35^{\circ}12'W$), Brazil.

Figure 2. Cont.

A further factor meriting consideration is the Earth's elliptical orbit. As the Sun is on one of the foci of this ellipse, this causes the Northern Hemisphere to be farther away from the sun in the summer in comparison to the Southern Hemisphere in the same season. Furthermore, other factors, some associated with anthropogenic activity, are capable of influencing UV incidence, *viz.*, air pollution/particulate matter emission, clouds (which can either diminish or increase UV irradiance), climate effects, albedo (the fraction of solar energy reflected from the Earth) and altitude [1,2].

Even though atmospheric ozone levels are recuperating, it remains uncertain whether climate change will delay or accelerate ozone recovery. As surface UV radiation levels continue on the rise, the consequential increase in risks involving both ecosystems and human health requires redoubled attention.

2. UV Effects on the Biosphere and Human Health

The biological consequences arising from increased UV irradiance are numerous. In terrestrial ecosystems, these affect plants, pathogens, herbivores, soil microbes and other basic processes. As each type of organism reacts to induced UV damage in a different manner, the eventual changes in balance can possibly lead to significant alterations in carbon and nitrogen cycling. Furthermore, apart from ozone concentration dependence, UV irradiance is also affected by climate change factors, thus complex interactions are expected to occur, thereby diversely affecting terrestrial ecosystems [3].

The effects of UV radiation on human health are better defined. Besides producing vitamin D, UVB radiation itself is correlated with skin cancer, photoaging, immunosuppression and cataracts, to mention just a few of the harmful effects. It is widely known that in humans the most important benefit derives from the production of vitamin D. Nevertheless, there is a limit in this production, which, when passed, leads to the degradation of already formed vitamins, thereby attaining toxic levels, whereby the efforts concentrated on determining the "optimal level" of production. It has been shown that casual, and little daily UV doses are sufficient to prevent the lack of vitamin D [4]. However, there is evidence that modern lifestyles can be held responsible for the increasing levels of melanoma among indoor-workers. It is speculated that windows and sunscreens, which block mainly UVB and facilitate

UVA penetration, give rise to a reduction in cutaneous vitamin D levels, possibly inversely correlated to the increase in the incidence of melanoma [5].

Mechanistically, UV irradiance is the cause of many deleterious effects, such as the induction of DNA damage, inseparable from those beneficial [6]. Furthermore, various UV wavelengths exhibit different skin-penetration capabilities, with diversification in carcinogenesis as the outcome [7].

Obviously, both ecosystems and the human population are always much more exposed to UVA than UVB irradiance, in absolute flow terms. Nevertheless, these values require weighting, using action spectra involving the relative biological effectiveness for various endpoints. With this in mind, knowledge on the UV pattern at different sites is of vital interest for determining the potential risks arising from local UV radiation worldwide. Thus, the development of appropriate biological sensors assumes an important role in a scenario of increasing UV incidence.

3. The DNA Molecule as the Main Target of UV Light in the Cells

The most important cellular effects induced by UV radiation (cell-death and mutagenesis) are directly related to a chain of events that primarily involve the induction of DNA lesions. Notwithstanding, the chemical nature and efficiency in the formation of DNA lesions greatly depend on the wavelength of incident UV photons [6,8] as well as on the base composition of the DNA molecule, as previously demonstrated. In fact, the absorption spectra of DNA from various species for wavelengths greater than 300 nm clearly indicated that its relative absorption increases as a function of guanine-cytosine content [9]. Therefore, as the maximum of light absorption by DNA molecules is 260 nm, UVC is revealed as being the most effective wavelength for the induction of DNA photoproducts. The absorption spectrum of a purified plasmid DNA sample is presented in Figure 3, as a demonstrative example.

Figure 3. The absorption spectrum for the DNA molecule. A sample of purified plasmid DNA (pCMUT vector), diluted in a TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) at the indicated concentration, was used to obtain this spectrum, with an Evolution 300 UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, USA).

The different wavelengths of UV light induce different types of DNA damage [10]. The direct excitation of the DNA molecule by UV sunlight (mainly by UVB wavelengths) results in well-known

modifications that trigger off dimerization reactions between adjacent pyrimidines. The main products resulting from these photochemical reactions are cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PPs) [6]. In addition, upon further irradiation with UVA wavelengths (around 320 nm), the normal isomers of 6-4 PP can be converted to their Dewar valence isomers [11,12]. However, in certain dormant life-forms produced by bacteria, such as *Bacillus subtilis*, the only DNA photoproduct produced upon exposure to UV light corresponds to two thymines linked by the methyl group of one of the bases. The formation of this specific lesion, viz., 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine (spore photoproduct, SP), is possibly due to specific features of the spores, these including DNA conformation (A form), dehydration, the presence of dipicolinic acid in the core, and the binding of small acid-soluble proteins to DNA [13].

Apart from direct induction of DNA lesions, UV radiation can also cause DNA damage indirectly, following photon absorption by chromophores other than DNA itself, thereby generating reactive oxygen species [14]. Oxidatively generated DNA damage, mostly in the form of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine (considered a marker for this type of damage), and which occurs more effectively with UVA than UVB, has often been proposed as a pre-mutagenic lesion in UVA mutagenesis [7,15-18]. Another type of UV-induced DNA lesion, although rather inefficiently so, is the single-strand break. It has also been suggested that this is probably an innocuous lesion with little involvement in the formation of mutations [6,19]. The main types of UV-induced DNA lesions are illustrated in Figure 4.

Figure 4. The main DNA lesions induced by UV light: CPD-cyclobutane pyrimidine dimer; 6-4PP-pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct; DewarPP-Dewar valence isomer; Single strand breaks; 8-oxoG-7, 8-dihydro-8-oxoguanine; Spore photoproduct.

It is well-known that solar UV radiation can generate chemical modifications in the DNA structure, leading to several biological consequences. Thus, in the evolution of life on Earth, cells have developed specific DNA repair mechanisms capable of dealing with different types of lesions. In both prokaryotes and eukaryotes, these biochemical pathways are indispensable for maintaining genomic integrity by removing damaged DNA bases or short fragments of nucleotides containing UV photoproducts. However, through inadequate repair, unremoved UV-induced DNA damage possibly

interferes with basic cellular processes, such as transcription and DNA replication, thereby leading to mutations and/or cell-death [20,21].

4. Biosensors for UV Light

In the 1980s, the discovery of a progressive decline in the stratospheric ozone layer and the consequential increase in UVB levels, aroused the interest of numerous research groups worldwide. There was a generalized attempt to evaluate the biological effects of solar UV radiation, through the development of dosimetric systems employing biological material [22,23]. In general, a biosensor integrates incident UV wavelengths of sunlight, thereby weighting them according to their respective biological effectiveness [24]. Hence, its spectral response is the related photobiological effect [25].

Over the latter decades, various simple test systems, such as provitamin D3 [26], uracil thin layers [24,27], DNA [6,28–30] or different bacteriophages [31,32], spores from *Bacillus subtilis* [23,25,33,34], and eukaryotic cells in culture [35], have been developed for use as biological UV dosimeters. Most of these tests reflect UV sensitivity of the main target of radiation in living organisms, by the direct or indirect measurement of DNA damaging capacity of solar UV radiation, as well as the initiating event in a variety of harmful effects to human health and life in general.

Considering that one of the most important criteria for the validity of a biosensor is the relevance of the respective photobiological/photochemical process, DNA-based biological dosimeters have a genuine biological appeal [25]. However, each type of biological material intended for use as a biological UV dosimeter needs to comply with several criteria, namely: (i) it should be clearly indicative of a certain biological effect induced by UV light that represents a possible risk or benefit to human health or ecosystems; (ii) the spectral response (UVB/UVA) should be in agreement with a specific photobiological process; (iii) quantification of the biological effects of UV light should be undertaken in measurable units; (iv) data should be reproducible; (v) the general requirements for radiometers (absolute response, linearity of response, angular response, and intercalibration with other biologically weighted spectroradiometers) should be complied with; (vi) the chosen biological system should be robust, with high resistance against changing environmental parameters, as temperature; (vii) suitability for routine measurement [22]. Below, features of the main biological models that have been developed for use as biodosimeters in the measurement of biological effectiveness of environmental UV radiation, will be described.

4.1. DNA Dosimetry

DNA, the genetic material of cells, is the main target molecule of UV radiation. As shown in Figure 3, this molecule possesses high sensitivity to short-wavelengths in the UV light spectrum (UVC > UVB > UVA), a feature that confers reasonable applicability for measuring the increasing incidence of solar UVB radiation, whence the various types of biological systems using DNA for evaluating the impact of UV light on the environment.

A UVB DNA-dosimeter was developed based on minidots of purified and dried (12–16 h at 40 °C) bacteriophage λ DNA placed on a UV transparent biofilm. In this system, photo-induced DNA damage blocks DNA synthesis during the polymerase chain reaction (PCR), thereby reducing the amount of amplified product of UV exposed DNA compared to control DNA. Thus, DNA lesions are indirectly

quantified. This type of DNA dosimeter was first developed for monitoring the biologically effective DNA-damaging capacity of UVB doses integrated over time. The short or long-term effects of UVB doses can be obtained by varying the length of the DNA fragment to be analyzed by the PCR reaction [28,31].

Another type of DNA dosimeter that makes use of bacteriophage DNA is the phage T7 dosimeter [32]. For measuring DNA damage, a quantitative polymerase chain reaction (QPCR) methodology was developed using 555 and 3,826 bp fragments of phage T7 DNA. Basically, this assay is the same as that described above, where photoproducts block DNA replication by *Taq* DNA polymerase, thereby reducing the amplification of a damaged DNA segment. In addition, by using this system, it is possible to determine the inactivation (killing) of a phage particle as a consequence of DNA damage induction after UV exposure [36,37]. The calculation of the biologically effective dose (BED) is proportional to the inactivation rate $[\ln(n/n_0)]$, where n_0 and n are the number of active phages without irradiation and after UV exposure, respectively, thus corresponding to the average amount of UV damage in one phage particle. Consequently, the unit dose for phage T7 is defined by a survival rate of e^{-1} or, in other words, an average of one unit of lethal damage per phage particle. The number of active phages is determined by using *E. coli* B host cells through the plaque counting assay [36].

Although uracil is a component of ribonucleic acid (RNA), the uracil thin layer dosimeter is included within this category of biological dosimetry, for means of comparison of this methodology to the other DNA dosimeters described here. Both the structure and conformation of uracil bases in the polycrystalline form of uracil are suitable for forming cyclobutane type pyrimidine dimers through the photodimerization of uracil monomers [25]. Hence, uracil thin layers can be used as a nucleic acid model, when considering UV damage induction [27,38]. The UV radiation effect on these layers can be measured by the decrease in absorbance at the characteristic absorption band of uracil, whence the use of the OD (optical density) value at 288 nm for quantifying UV damage after biodosimeter exposure to various sources of UV radiation [38].

There are also DNA dosimeters based on the exposure of naked DNA solutions to sunlight. In one of the examples, a naked calf thymus DNA solution (10 mg L^{-1}), stowed in cylindrical quartz tubes, was exposed to ambient solar radiation in Antarctica from October to December, 1998, for 3 h daily (12.00–15.00 h) during the UVB radiation-peak. The induction of CPDs was detected through the use of a specific antibody against this type of UV photoproduct. The results could be related to cloud-cover, ozone-column depth and spectrophotometric measurements of solar UV radiation. In short, subtle changes in solar spectral characteristics caused by ozone depletion could be detected with this biodosimeter. The highest CPD concentrations were observed when ozone-mediated shifts favored the shorter wavelengths of UVB radiation [30]. Actually, in the same year, another research work, also applying a naked calf-thymus DNA solution in quartz tubes, was published simultaneously and in the same volume of the journal. This DNA dosimeter was complemented with a phage dosimeter consisting of intact bacteriophage PWH3a-P1, which infects the heterotrophic bacterium *Vibrio natriegens*, thus facilitating the quantification of infectivity efficiency after exposure to sunlight. The viral and DNA dosimeters were applied together, whereupon a strong correlation was observed between dimer formation and the decay rates of viral infectivity, in accordance with increasing penetration of UVB radiation into the water column in the western Gulf of Mexico [39].

Our group also developed a suitable DNA-dosimeter system based on the exposure of a plasmid DNA solution (*pCMUT* vector) to artificial UV lamps and sunlight. In order to provide ample comprehension of the deleterious effects of solar UV radiation upon DNA molecules, different types of DNA damages (CPD, 6-4PP, and oxidized bases) were determined and quantified through the use of specific DNA repair enzymes and antibodies [6]. The biological effects of such lesions were also defined through the analysis of DNA inactivation rates and mutation frequencies, following replication of the damaged *pCMUT* vector in an *Escherichia coli* *MBL50* strain [15]. The most relevant results obtained with these very sensitive technologies, established the induction of CPD, as well as 6-4PP by UVA wavelengths. In order to demonstrate the biological effects of these DNA damages, mutagenesis and DNA inactivation were directly associated to the formation of large distorting DNA lesions, such as CPDs. These effects were not associated to the induction of oxidatively generated damage, independent of the UV wavelength applied (UVC, UVB, UVA, and sunlight) [6,15].

Extremely important information regarding DNA dosimetry is the manner in which DNA samples are exposed to UV radiation. Experiments performed in our lab indicated that the efficiency of UV photoproduct induction, mainly CPD and 6-4PP, depends very much on the way irradiation is being carried out, in other words, either with the DNA sample diluted in a water/buffer solution or dehydrated thus forming thin layers on a surface. Furthermore, a previous work demonstrated that UVC irradiation carried out with a DNA sample in the dry state resulted in the formation of spore photoproducts, besides CPD and 6-4PP [13]. The induction of this specific UV photoproduct, noted in spores of certain bacteria, is not observed when DNA is irradiated in its physiological aqueous environment within all other types of cells. Therefore, a comparison was made of the induction of T4-endonuclease V-sensitive sites (T4-endo V-SS correspond to CPD) and Ultraviolet Damage Endonuclease-sensitive sites (UVDE-SS correspond to CPD, 6-4PP and other distorting DNA lesions), in DNA samples exposed to UVC light, in both the dry state and diluted in a buffer solution (TE buffer-10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]). The results are presented in Figure 5.

As shown, the induction of these lesions readily decreases when DNA samples are exposed to UVC light under dry conditions, when compared to samples maintained in a buffer during irradiation, thus indicating lower frequencies of photoproduct production under dry than wet conditions. Furthermore, the induction of T4-endo V-SS was 4.6-fold higher in the wet state than the dry, while the induction of UVDE-SS was only 2.3-fold higher, when so compared. Another important observation was that the ratios between the induction of putative CPDs and 6-4PPs (T4-endo V-SS/UVDE-SS-T4-endo V-SS) in the wet and dry states were 3.1 and 0.6, respectively. This implies the formation of photoproducts different from CPD or 6-4PP in DNA samples irradiated in the dry state, and which could be recognized by UVDE, thus decreasing the above ratio. Although the chemical analysis of this damage was not undertaken, it is presumed to be a spore photoproduct. The use of specific antibodies against CPD and 6-4PP would also help to better elucidate this question. Altogether, answers to these questions are important to understand mechanisms of UV-induced DNA damage, when this molecule is irradiated in dry conditions. Interestingly, a previous work had observed an important increase in the formation of inter-strand photoproducts when DNA is irradiated in the A-conformation, which would be predominant when this molecule is dried. In these conditions 6-4PPs were also detected in UVC irradiated DNA [40].

Figure 5. Analysis of UVC-induced DNA lesions induced in DNA in a buffer or under dry conditions. **(A)** Representative example of DNA photolesion induction after DNA exposure to UVC radiation. Plasmid DNA samples were UVC-exposed either diluted in a TE buffer (wet) or dried on a glass surface (dry) at room temperature and atmospheric pressure. 200 ng of both recovered DNA samples were treated with T4-endo V and UVDE enzymes. FI indicates the supercoiled DNA form and FII the relaxed DNA form resulting from enzymatic cleavage of DNA photoproducts. **(B)** Quantification of DNA photoproducts after UVC lamp exposure. T4-endo V-SS—T4-endonuclease V sensitive sites; UVDE-SS—Ultraviolet Damage Endonuclease sensitive sites (for details of the methodology employed the reader should refer to [6]).

4.2. Spore Dosimetry

A spore dosimeter was developed, as a prototype biosensor for defining the DNA damaging capacity of UV irradiation. Biological measurements of solar UV irradiation using this biological system have been under way since 1999, at more than 20 sites in Asia, Europe and South America [41]. This biodosimeter reveals several features that make it suitable for worldwide comparison and long-term monitoring. It is based on the measurement of spore inactivation, when using highly UV-sensitive spores of a mutant strain of *Bacillus subtilis*, defective in both nucleotide excision repair and spore-photoproduct lyase [42,43]. The mutated spores are irradiated, spotted and dried on membrane filters. The greater part of inactivation is probably due to the formation of spore photoproducts (5-thymine-5,6-dihydrothymine). The spore inactivation dose can be calculated from the absolute value of the natural logarithm of the surviving fraction: $SID = -\ln(N_e/N_c)$, N_e and N_c

being the average of colony-formers recovered from exposed and control spots [23]. Results reported in the literature demonstrate the usefulness of spore dosimetry in the continuous long-term measurement of biologically effective solar-UV irradiation at different latitudes [23,41,44]. Moreover, other additional works indicate this biological system to be one of the most versatile and convenient approaches to monitor human personal exposure to sunlight [33-45].

Similar to the spore dosimeter described above, another type of biological UV dosimeter, also employing *B. subtilis* spores, is the DLR-biofilm. In this case, an appropriate strain of *B. subtilis* needs to be chosen, depending on the dosimetric requirements of individual measurement. DNA-repair deficient strains can be used in DLR-biofilm dosimeters for short-term measurements (≥ 10 min), whereas DNA-repair wildtype strains are used for longer-term exposures (≤ 2 months). In general, DLR-biofilms are exposed in different types of exposure-boxes, with some areas remaining unexposed, to thus serve as dark controls during the period of exposure. The biofilm exposure housings are made of plastic and contain a spore biofilm in a water-tight biofilmstack. The DLR-biofilm method has also been adapted for application as a personal UV dosimeter [22].

4.3. Mammalian Cell Dosimetry

Compared to the other types of biological dosimeters, there is little information in the literature on systems that use mammalian cells as biodosimeters. On the other hand, there are several works reporting the use of efficient methodologies to quantify the hazardous effects of UV radiation upon these cells. An example worth mentioning is a rapid and convenient assay for the measurement of DNA damage and repair in specific genes using quantitative polymerase chain reaction (QPCR) of fragments from human genomic DNA after exposure to UVC light [46]. The same methodology, although in a different model, was applied to characterize the repair of DNA damage induced by UVC radiation in *C. elegans* [47]. Another highly accurate and quantitative assay that can be included here is based on HPLC coupled with tandem mass spectrometry. Through this approach, it was possible to assess the repair of the main photolesions in primary cultures of human keratinocytes [12] and to determine the type and the yield of formation of DNA damage in whole human skin exposed to UVB or UVA [10].

Nevertheless, in the higher organisms, complex responses, such as immunosuppression, tumor promotion, virus induction and photocarcinogenesis, require consideration after UV exposure [48-52]. Consequently, the use of laboratory animals, or at least human or animal cell-cultures, thereby replacing animal tests in biomedical research, is of great interest [53]. With this in mind, a biological UV dosimeter using rodent cells (RoDos) has been developed. The cells involved are Chinese hamster ovary cells AA8 (ATCC CRL-1859, repair proficient) and UV5 (ATCC CRL-1865, defective in nucleotide excision repair gene ERCC2). The RoDos dosimeter comprises two parts: (i) Rodent cells growing on a UV-transparent petriPERM[®] foil. (ii) A special device, which facilitates exposure of growing cells to different doses of UV light, and the cultivation of cells in exposed and unexposed areas of the petriPERM[®] dish under identical conditions. The influence of UV exposure on cell growth is determined by image analysis, involving the correlations of optical densities (OD) of irradiated to unirradiated areas. It is suitable for evaluating the cytotoxic effects of simulated sunlight, as well as characterizing UV sources and the protective capacity of sunscreens [35].

Another different *in vitro* system is used as a photobiological tool for evaluating the molecular response of simulated sunlight upon human keratinocytes growing as monolayers or as part of reconstructed skin. In fact, although not strictly a biological dosimeter, it can also be applied when assessing the photoprotection of sunscreens associated with DNA photodamage, whereat the formation of single strand breaks (SSB) and CPDs by comet assaying, and the induction of transcription factor p53, are the main parameters considered. These models are suitable in the development of quantitative methodologies for use as alternative *in vivo* tests, when assessing the photoprotective efficacy of sunscreens [54].

Furthermore, and also for evaluation of sunscreens, another *in vitro* model of reconstructed skin has been developed for exposures to simulated daily irradiation with or without photoprotection. The biological effects induced after irradiation in a solar simulator are assessed by the histology of artificial skin, vimentin immunostaining for dermal fibroblasts, and the analysis of matrix metalloproteinase (MMP)-1 secretion. On considering these evaluated endpoints, it has been suggested that sunscreen ingredients should be better balanced with an adequate level of UVA absorption, to thus ensure efficient daily photoprotection. There are also indications that higher SPF (Sun Protection Factor) values were not proportionally paralleled by the UVA screening capacity of the formulation [55].

4.4. Vitamin D Dosimetry

Contrary to most biological dosimeters that incorporate DNA sensitivity to the damaging effects from UV radiation, the process of vitamin D synthesis is beneficial by nature. In fact, vitamin D synthesis, the most well-known and well-documented beneficial effect of solar UVB irradiation, consists of two basic stages, *viz.*, the photosynthesis of previtamin D (provitamin D photoisomerization), and its thermoconversion into vitamin D. The former constitutes the base of Vitamin D dosimetry. The kinetics of previtamin D accumulation is intimately related to the endpoint of the reaction in vitamin D synthesis, and represents the biological effect under study in this case [26].

The vitamin D dosimeter uses a low-concentrated solution of provitamin D (ergosterol or 7-dehydrocholesterol), diluted in ethanol ($C = 0.002\%$) and stored in quartz cuvettes for UV irradiation. Before exposure to sunlight the absorption spectrum is recorded by a spectrophotometer within the 230–330 nm range. The daily accumulated dose is measured through daytime exposure of the solution, with hourly absorption-spectra monitoring. In fact, the values of provitamin D-photoconversion are accompanied by absorption spectrum changes, with the OD decreasing at 282 nm. Thus, through optical analysis, a function of the exposure time can be evaluated in order to determine the biologically effective dose of sunlight [26].

5. Conclusions and Perspectives

In a scenario of uncertainty as to the effects of climate change upon the incidence of solar UV irradiation, the application of biosensors parallel to physical photometry will be of aid in obtaining important information for the future protection of ecosystems and human health. The biosensors described in this work are compared in Table 1.

Table 1. Comparison of different biosensors.

Method [reference]	Sensitivity (minimal UV dose)	Endpoint analysed	Approach	Positive Features
Vitamin D [26]	40.0 J/m ² (282 nm)	Photoisomer concentration	Spectrophotometric	Chemical measurements, analysis a beneficial effect, easy to perform, high spectral selectivity.
Uracil thin layer-OD [24]	10.0 J/m ² (254 nm)	Polycrystalline uracil thin-layer	Spectrophotometric	Chemical measurements, easy to perform.
Uracil thin layer- OWLS [27]	0.8 J/m ² (254 nm)	Optogeometrica l parameters of a thin layer	Refractive index changes	Chemical measurements, easy to perform.
Bacteriophage λ DNA [31]	6.1 kJ/m ² (sunlight)	DNA polymerase blockage	PCR	Portable, robust, stability.
Phage T7 DNA [32]	10.0 J/m ² (254 nm)	DNA polymerase blockage	QPCR	Portable, robust, stability.
Naked calf thymus DNA solution [62]	~10.0 J/m ² (equivalent to UVB)	CPDs	Antibodies	Portable, direct lesion measurements.
Naked calf-thymus DNA + bacteriophage PWH3a-P1 [39]	1.9 kJ/m ² (305 nm) 41.0 kJ/m ² (320 nm)	CPDs, plaque forming units	Radioimmunoassay, viral infectivity	Portable, direct lesion measurements, determines biological activity.
Plasmid DNA [6]	50.0 J/m ² (UVC) 2.0 kJ/m ² (UVB) 50.0 kJ/m ² (UVA)	CPDs, (6-4)PPs, oxidized bases, SSBs, plasmid viability	DNA repair enzymes, antibodies, alkali treatment, genotoxic effects	Portable, robust, direct and specific lesions measurements, determines biological activity.
<i>B. subtilis</i> spore [41]	650.0 J/m ² (sunlight)	Colony forming units	Spore inactivation	Portable, robust, easy to perform, determines biological activity.
DLR-biofilm, <i>B.subtilis</i> spore [22]	10.0 J/m ² (254 nm)	Optical density	Image analysis	Portable, robust, easy to perform.
RoDos [63]	1.0 J/m ² (UVC)	Colonies, optical density	Cellular survival, image analysis	Direct evaluation of biological effects on mammalian cells
Human keratinocytes [54]	3.5 kJ/m ² (UVB) 42.7 kJ/m ² (UVA)	CPDs, SSBs	Comet assay, antibodies	Direct evaluation of biological effects on human cells
Reconstructed skin [54]	3.5 kJ/m ² (UVB) 42.7 kJ/m ² (UVA)	CPDs, SSBs	Comet assay, antibodies	Direct evaluation of biological effects on human cells

Many are portable and easy to use, but yield information limited to the effects on the molecules themselves, while others allow indication of biological activities. The use of mammalian cells consists, obviously, on measurements closer to the effects in human, but these cells are more difficult to handle. Notwithstanding, further development in mammalian-cell biodosimeters is still a basic requirement for biomedical studies. In this sense, it is interesting to mention human patients bearing the xeroderma pigmentosum (XP) syndrome, an autosomal recessive genetic disorder that is clinically characterized by the increased frequency of skin cancer in those regions of the body that are normally exposed to sunlight. Fibroblasts from these patients, besides being very sensitive to UV, are defective in their

capacity to remove (nucleotide excision repair) or to replicate (translesion synthesis) UV-induced DNA photoproducts [56]. An interesting approach to obtain sensitive and biologically relevant information on sunlight deleterious action would be by using of XP derived DNA repair-deficient human-skin cells. These cells could constitute a powerful tool for assessing the harmful effects of sunlight on human genomic DNA, and the consequences arising from the induction of different processes of cell-death and mutagenesis. Moreover, the development of biological dosimeters based on the cells from these patients could complement the evaluation of the photoprotection potential of sunscreens, and be of aid in the development of new and more efficient UV-protecting products focused on the specific needs of this group of people.

In another approach, one of the most exciting promises in this field is the application of biological dosimetry to astrobiological exploration programs. The proposed experiments would provide tools for the scientific investigation of those processes involved in the birth and evolution of life on Earth, besides possibly demonstrating the importance of protecting the Earth's future environment from anthropogenic emission of destructive gases that could compromise the ozone layer. Most of the biodosimeters described here, *viz.*, DNA-dosimeters [57,58], uracil thin layers [38], and spore dosimeters [59–61], are potentially applicable in astrobiological studies.

Thus, novel UV-sensors based on biological models are an increasing requirement for an enormous range of applications, and continuous efforts in scientific and technological research are essential for a better comprehension of the expected environmental changes.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (São Paulo, Brazil), CNPq (Brasília, Brazil), by the Frontier Project “Adaptation and Evolution of Extremophile” from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and by the Laboratory of Science and Engineering, Takushoku University, Japan. We also wish to thank Nelson Schuch (Southern Regional Space Research Center, CRS/INPE-MCT, Santa Maria, RS, Brazil) and Lucymara Fassarella-Agneis (Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil), for providing UVA and UVB dose measurements.

References

1. McKenzie, R.L.; Aucamp, P.J.; Bais, A.F.; Bjorn, L.O.; Ilyas, M. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 218–231.
2. Godar, D.E. UV doses worldwide. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 736–749.
3. Caldwell, M.M.; Bornman, J.F.; Ballare, C.L.; Flint, S.D.; Kulandaivelu, G. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 252–266.
4. Wolpowitz, D.; Gilchrest, B.A. The vitamin D questions: how much do you need and how should you get it? *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *54*, 301–317.
5. Godar, D.E.; Landry, R.J.; Lucas, A.D. Increased UVA exposures and decreased cutaneous Vitamin D(3) levels may be responsible for the increasing incidence of melanoma. *Med. Hypotheses* **2009**, *72*, 434–443.

6. Schuch, A.P.; da Silva Galhardo, R.; de Lima-Bessa, K.M.; Schuch, N.J.; Menck, C.F. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 111–120.
7. Agar, N.S.; Halliday, G.M.; Barnetson, R.S.; Ananthaswamy, H.N.; Wheeler, M.; Jones, A.M. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4954–4959.
8. Runger, T.M. How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: the role of cellular damage responses. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 2103–2105.
9. Sutherland, J.C.; Griffin, K.P. Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm. *Radiat. Res.* **1981**, *86*, 399–410.
10. Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13765–13770.
11. 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**, *275*, 26732–26742.
12. Courdavault, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Canguilhem, B.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair* **2005**, *4*, 836–844.
13. Chandor, A.; Berteau, O.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Sanakis, Y.; Ollagnier-de-Choudens, S.; Atta, M.; Fontecave, M. Dinucleotide spore photoproduct, a minimal substrate of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26922–26931.
14. Cadet, J.; Sage, E.; Douki, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *571*, 3–17.
15. Schuch, A.P.; Menck, C.F. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J. Photochem. Photobiol. B* **2010**, *99*, 111–116.
16. Piette, J.; Merville-Louis, M.P.; Decuyper, J. Damages induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem. Photobiol.* **1986**, *44*, 793–802.
17. Kozmin, S.; Slezak, G.; Reynaud-Angelin, A.; Elie, C.; de Rycke, Y.; Boiteux, S.; Sage, E. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13538–13543.
18. Dahle, J.; Brunborg, G.; Svendsrud, D.H.; Stokke, T.; Kvam, E. Overexpression of human OGG1 in mammalian cells decreases ultraviolet A induced mutagenesis. *Cancer Lett.* **2008**, *267*, 18–25.
19. Dunn, J.; Potter, M.; Rees, A.; Runger, T.M. Activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway and recombination repair in the cellular response to solar ultraviolet light. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11140–11147.
20. Costa, R.M.; Chigancas, V.; Galhardo Rda, S.; Carvalho, H.; Menck, C.F. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* **2003**, *85*, 1083–1099.
21. Batista, L.F.; Kaina, B.; Meneghini, R.; Menck, C.F. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat. Res.* **2009**, *681*, 197–208.
22. Rettberg, P.; Cockell, C.S. Biological UV dosimetry using the DLR-biofilm. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 781–787.

23. Munakata, N.; Cornain, S.; Kanoko, M.; Mulyadi, K.; Lestari, S.; Wirohadidjojo, W.; Bolsee, D.; Kazadzis, S.; Meyer-Rochow, V.; Schuch, N.; *et al.* Biological monitoring of solar UV radiation at 17 sites in Asia, Europe and South America from 1999 to 2004. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 689–694.
24. Grof, P.; Gaspar, S.; Ronto, G. Use of uracil thin layer for measuring biologically effective UV dose. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 800–806.
25. Berces, A.; Fekete, A.; Gaspar, S.; Grof, P.; Rettberg, P.; Horneck, G.; Ronto, G. Biological UV dosimeters in the assessment of the biological hazard from environmental radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *53*, 36–43.
26. Galkin, O.N.; Terenetskaya, I.P. ‘Vitamin D’ biodosimeter: Basic characteristics and potential applications. *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *53*, 12–19.
27. Horvath, R.; Kerekgyarto, T.; Csucs, G.; Gaspar, S.; Illyes, P.; Ronto, G.; Papp, E. The effect of UV irradiation on uracil thin layer measured by optical waveguide lightmode spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 17–21.
28. Yoshida, H.; Regan, J.D. UVB DNA dosimeters analyzed by polymerase chain reactions. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 82–88.
29. Regan, J.D.; Yoshida, H. DNA UVB dosimeters. *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, *31*, 57–61.
30. George, A.L.; Peat, H.J.; Buma, A.G. Evaluation of DNA dosimetry to assess ozone-mediated variability of biologically harmful radiation in Antarctica. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 274–280.
31. Yoshida, H.; Regan, J.D. Solar UVB dosimetry by amplification of short and long segments in phage lambda DNA. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 672–675.
32. Hegedus, M.; Modos, K.; Ronto, G.; Fekete, A. Validation of phage T7 biological dosimeter by quantitative polymerase chain reaction using short and long segments of phage T7 DNA. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *78*, 213–219.
33. Munakata, N.; Ono, M.; Watanabe, S. Monitoring of solar-UV exposure among schoolchildren in five Japanese cities using spore dosimeter and UV-coloring labels. *Jpn. J. Cancer Res.* **1998**, *89*, 235–245.
34. Munakata, N.; Makita, K.; Bolsée, D.; Gillotay, D.; Horneck, G. Spore dosimetry of solar UV radiation: Applications to monitoring of daily irradiance and personal exposure. *Adv. Space Res.* **2001**, *26*, 1995–2003.
35. Rettberg, P.; Horneck, G.; Baumstark-Khan, C.; Amanatidis, G.T. *Biological UV Dosimetry, a Tool for Assessing the Impact of UV Radiation on Health and Ecosystems*; European Commission: Brussels, Belgium, 1999.
36. Rontó G.; Gaspar, S.; Berces, A. Phages T7 in biological UV doses measurement. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1992**, *12*, 285–294.
37. Rontó G.; Gáspár, S.; P.G.; Bérces, A.; Gugolya, Z. Ultraviolet dosimetry in outdoor measurements based on bacteriophage T7 as a biosensor. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 209–214.
38. Kovacs, G.; Fekete, A.; Berces, A.; Ronto, G. The effect of the short wavelength ultraviolet radiation. An extension of biological dosimetry to the UV-C range. *J. Photochem. Photobiol. B* **2007**, *88*, 77–82.

39. Wilhelm, S.W.; Jeffrey, W.H.; Suttle, C.A.; Mitchell, D.L. Estimation of biologically damaging UV levels in marine surface waters with DNA and viral dosimeters. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 268–273.
40. Douki, T.; Laporte, G.; Cadet, J. Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A—DNA exposed to UVC radiation. *Nucl. Acid. Res.* **2003**, *31*, 3134–3142.
41. Munakata, N.; Kazadzis, S.; Bolsee, D.; Schuch, N.; Koskela, T.; Karpetchko, A.; Meleti, C.; Casiccia, C.; Barcellos da Rosa, M.; Saida, T.; *et al.* Variations and trends of biologically effective doses of solar ultraviolet radiation in Asia, Europe and South America from 1999 to 2007. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1117–1124.
42. Munakata, N. Killing and mutagenic action of sunlight upon *Bacillus subtilis* spores: a dosimetric system. *Mutat. Res.* **1981**, *82*, 263–268.
43. Munakata, N.; Rupert, C.S. Dark repair of DNA containing “spore photoproduct” in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **1974**, *130*, 239–250.
44. Schuch, A.P.; Guarnieri, R.A.; Rosa, M.B.; Pinheiro, D.K.; Munakata, N.; Schuch, N.J. Comparison of biologically effective doses of solar UV-radiation with spore dosimetry and spectral photometry in 2000–2003 at Southern Space Observatory, Brazil. *Adv. Space Res.* **2006**, *37*, 1784–1788.
45. Ono, M.; Munakata, N.; Watanabe, S. UV exposure of elementary school children in five Japanese cities. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 437–445.
46. Van Houten, B.; Cheng, S.; Chen, Y. Measuring gene-specific nucleotide excision repair in human cells using quantitative amplification of long targets from nanogram quantities of DNA. *DNA Repair* **2000**, *460*, 81–94.
47. Meyer, J.N.; Boyd, W.A.; Azzam, G.A.; Haugen, A.C.; Freedman, J.H.; Van Houten, B. Decline of nucleotide excision repair capacity in aging *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R70.
48. Hart, P.H.; Grimbaldston, M.A.; Swift, G.J.; Jaksic, A.; Noonan, F.P.; Finlay-Jones, J.J. Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 2045–2053.
49. Brash, D.E.; Ziegler, A.; Jonason, A.S.; Simon, J.A.; Kunala, S.; Leffell, D.J. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1996**, *1*, 136–142.
50. Beer, J.Z.; Zmudzka, B.Z. Effects of UV on HIV and other infections. Introduction. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 231–233.
51. Zmudzka, B.Z.; Miller, S.A.; Jacobs, M.E.; Beer, J.Z. Medical UV exposures and HIV activation. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 246–253.
52. Scharffetter-Kochanek, K.; Wlaschek, M.; Brenneisen, P.; Schauen, M.; Blandschun, R.; Wenk, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1247–1257.
53. Broadhead, C.L.; Bottrill, K. Strategies for replacing animals in biomedical research. *Mol. Med. Today* **1997**, *3*, 483–487.

54. Marrot, L.; Planel, E.; Ginestet, A.C.; Belaidi, J.P.; Jones, C.; Meunier, J.R. *In vitro* tools for photobiological testing: Molecular responses to simulated solar UV of keratinocytes growing as monolayers or as part of reconstructed skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 448–458.
55. Lejeune, F.; Christiaens, F.; Bernerd, F. Evaluation of sunscreen using a reconstructed skin model exposed to simulated daily ultraviolet radiation: Relevance of filtration profile and SPF value for daily photoprotection. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2008**, *24*, 249–255.
56. de Lima-Bessa, K.M.; Armelini, M.G.; Chigancas, V.; Jacysyn, J.F.; Amarante-Mendes, G.P.; Sarasin, A.; Menck, C.F. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair* **2008**, *7*, 303–312.
57. Fekete, A.; Kovács, G.; Hegedűs, M.; Módos, K.; Lammer, H. Biological response to the simulated Martian UV radiation of bacteriophages and isolated DNA. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2008**, *92*, 110–116.
58. Hegedűs, M.; Kovács, G.; Módos, K.; Rontó, G.; Lammer, H.; Panitz, C.; Fekete, A. Exposure of phage T7 to simulated space environment: The effect of vacuum and UV-C radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *82*, 94–104.
59. Rettberg, P.; Horneck, G. Biologically weighted measurement of UV radiation in space and on Earth with the biofilm technique. *Adv. Space Res.* **2000**, *26*, 2005–2014.
60. Horneck, G.; Bucker, H.; Dose, K.; Martens, K.D.; Bieger, A.; Mennigmann, H.D.; Reitz, G.; Requardt, H.; Weber, P. Microorganisms and biomolecules in space environment experiment ES 029 on Spacelab-1. *Adv. Space Res.* **1984**, *4*, 19–27.
61. Cockell, C.S.; Horneck, G. The history of the UV radiation climate of the earth—theoretical and space-based observations. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 447–451.
62. Boelen, P.; Obernosterer, I.; Vink, A.A.; Buma, A.G.J. Attenuation of biologically effective UV radiation in tropical atlantic waters measured with a biochemical DNA dosimeter. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 34–40.
63. Baumstark-Khan, C.; Hellweg, C.E.; Scherer, K.; Horneck, G. Mammalian cells as biomonitors of UV-exposure. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *387*, 281–287.

Research Article

DNA Damage Profiles Induced by Sunlight at Different Latitudes

André Passaglia Schuch,¹ Teiti Yagura,¹ Kazuo Makita,²
Hiromasa Yamamoto,³ Nelson Jorge Schuch,⁴
Lucymara Fassarella Agnez-Lima,⁵ Ricardo Monreal MacMahon,⁶ and
Carlos Frederico Martins Menck^{1*}

¹Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences,
University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Faculty of Engineering, Takushoku University, Tokyo, Japan

³Department of Physics, Rikkyo University, Tokyo, Japan

⁴Southern Regional Space Research Center, CRSPE/INPE—MCT,
Santa Maria, RS, Brazil

⁵Department of Genetics and Cell Biology, Federal University of Rio
Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

⁶Department of Mathematics and Physics, University of Magallanes,
Punta Arenas, Chile

Despite growing knowledge on the biological effects of ultraviolet (UV) radiation on human health and ecosystems, it is still difficult to predict the negative impacts of the increasing incidence of solar UV radiation in a scenario of global warming and climate changes. Hence, the development and application of DNA-based biological sensors to monitor the solar UV radiation under different environmental conditions is of increasing importance. With a mind to rendering a molecular view-point of the genotoxic impact of sunlight, field experiments were undertaken with a DNA-dosimeter system in parallel with physical photometry of solar UVB/UVA radiation, at various latitudes in South America. On applying biochemical and immunological approaches based on specific DNA-repair enzymes

and antibodies, for evaluating sunlight-induced DNA damage profiles, it became clear that the genotoxic potential of sunlight does indeed vary according to latitude. Notwithstanding, while induction of oxidized DNA bases is directly dependent on an increase in latitude, the generation of 6-4PPs is inversely so, whereby the latter can be regarded as a biomolecular marker of UVB incidence. This molecular DNA lesion-pattern largely reflects the relative incidence of UVA and UVB energy at any specific latitude. Hereby is demonstrated the applicability of this DNA-based biosensor for additional, continuous field experiments, as a means of registering variations in the genotoxic impact of solar UV radiation. *Environ. Mol. Mutagen.* 00:000–000, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: solar ultraviolet radiation; DNA photoproducts; biological dosimetry; DNA-dosimeter

INTRODUCTION

Human industrial activities, as well as the release of destructive gases, have been deranging atmospheric balance over the last centuries. In a scenario of stratospheric ozone depletion, compounds, such as chlorofluorocarbons (CFCs), have been playing a leading role. The discovery of the ozone “hole” in the 1980’s has led to grave concern worldwide, since intensified UVB radiation (280–315 nm), through inducing greater damage to a wide range of organic molecules, including DNA, generally enhances the harm to several biological and physical processes [Takahashi and Ohnishi, 2004; Andradý et al., 2007; Caldwell et al., 2007; McKenzie et al., 2007; Zepp et al., 2007].

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsors: FAPESP (São Paulo, Brazil), CNPq (Brasília, Brazil), Frontier Project “Adaptation and Evolution of Extremophile” of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, Laboratory of Science and Engineering, Takushoku University, Japan.

*Correspondence to: Dr. Carlos Frederico Martins Menck, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil. E-mail: cfmменck@usp.br

Received 14 September 2011; provisionally accepted 6 December 2011; and in final form 6 December 2011

DOI 10.1002/em.21678

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

The most important cellular effects arising from UV radiation, namely, cell-death and mutagenesis, are directly related to a chain of events that mainly involve the induction of DNA lesions. Nonetheless, the chemical nature, as well as the efficiency in the formation of DNA lesions, greatly depends on the wavelength of incidental UV photons. Hence, different wavelengths of UV light induce different types of DNA damage. For example, through direct excitation by sunlight UV components, mainly UVB wavelengths, the DNA molecule undergoes well-known modifications that trigger dimerization reactions between adjacent pyrimidines. The main products resulting from these photochemical reactions are cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PPs) [Schuch et al., 2009]. In addition, on further irradiation with UVA wavelengths (315–400 nm) at around 320 nm, normal isomers of 6-4PPs can be converted into their respective Dewar valence isomers (DewarPPs) [Perdiz et al., 2000]. On the other hand, UV radiation can also indirectly damage DNA after the absorption of its photons by other chromophores, thereby generating reactive oxygen species. Oxidatively generated DNA damage, such as 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8oxodG), which is more effectively induced with UVA than UVB [Schuch and Menck, 2010], has often been considered as a premutagenic lesion in UVA mutagenesis [Piette et al., 1986; Agar et al., 2004; Kozmin et al., 2005; Dahle et al., 2008], whereas single strand breaks (SSBs) are probably not involved [Dunn et al., 2006; Schuch et al., 2009]. Therefore, several alternative biological consequences can arise from an altered increase in incident UV irradiance.

Fortunately, with global efforts addressed to diminishing ozone-depleting substances, recent measures have revealed a constant increase in ozone levels worldwide. Nevertheless, even though atmospheric ozone levels are undergoing restoration, it remains unclear whether climate change will delay or accelerate ozone recovery [McKenzie et al., 2007]. Hence, directed studies are essential to guiding health-care decisions, as well as future policy programs related to variations in UV radiation caused by climate change and ozone depletion [UNEP, 2010].

Thus, the increment of research projects with interdisciplinary approaches, and focused on the evaluation of biological effects induced by natural sunlight, is becoming an urgent necessity, in an attempt to avoid serious consequences for coming decades. In this sense, various simple test systems have already been developed for use as biological dosimeters of UV components in sunlight. Most largely reflect UV sensitivity of the main target of UV radiation in living organisms, by measuring, directly or indirectly, the DNA damaging capacity of solar UV radiation, as the initiating event in various harmful effects to human health and life in general [Yagura et al., 2011].

Hereby, the environmental application of a highly UV-transparent DNA-based biosensor [Schuch et al., 2009] is

described after exposure of sunlight at different latitudes in Brazil and Chile, parallel to the use of physical UVB/UVA radiometers. The DNA damage profiles induced by sunlight at each location were determined by DNA repair enzymes [*E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) recognizes mainly oxidized purine bases; the T4 bacteriophage endonuclease V (T4-endo V) recognizes mainly CPD; and the yeast ultraviolet damage endonuclease (UVDE) recognizes large distortions in DNA double helix, such as, CPDs, 6-4PPs, and DewarPPs]. Specific antibodies were also used in immunoblot assaying to confirm the induction of CPDs and 6-4PPs after exposure to sunlight. The use of this DNA-dosimeter to measure the daily genotoxic impact of sunlight revealed the variations in DNA damage profiles related to solar UVB/UVA incidence, observed at several latitudes.

MATERIAL AND METHODS

Plasmid

For plasmid DNA purification the *E. coli* strain *DH10b* (F^- , *mcrA* [*mrr-hsdRMS-mcrBC*], 80*lac*-ZM15, *lacX*74, *deoR*, *recA*1, *endA*1, *ara*139, *galU*, *galK*, *rpsL*, *nupG*, *tonA*, *STM*^R) was made electrocompetent [Datsenko and Wanner, 2000] and transformed with *pCMUT* vector (1,762 bp; *C*, chloramphenicol resistance and *MUT*, *supF* mutation target gene) [Schuch et al., 2009], which is the target DNA molecule for solar UV radiation. Purification of DNA samples was prepared by using Qia-gen Plasmid Maxi Kit (Valencia, CA), and stored in TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 1 mM EDTA] at -20°C , until the beginning of the experiments.

Exposures of DNA Samples to Sunlight and Measurements of Solar UV Doses

With the exception of São Paulo, Brazil, where experiments were carried out throughout the year (2008), daily environmental exposures of plasmid DNA samples to sunlight were carried out in triplicate in other towns throughout South America, during the southern hemisphere summer, to so evaluate the genotoxic impact of sunlight under the maximum incidence of UV radiation. Hence, sunlight exposures in Punta Arenas, Chile, were anticipated to the southern hemisphere spring, due to the occurrence of the ozone hole phenomenon at this latitude. Briefly, the studied locations were Punta Arenas, extreme south Chile ($53^{\circ}1'S$; $70^{\circ}9'O$), where three exposures (October 6, 8, 9, 2008) were undertaken; São Martinho da Serra, south Brazil ($29^{\circ}4'S$; $53^{\circ}8'O$), with three exposures (December 27 and 29, 2006, and January 4, 2007); São Paulo, southeast Brazil ($23^{\circ}3'S$; $46^{\circ}4'O$), with the largest number of exposures (April 25, June 3, July 1, July 21, August 8, December 5, and December 8, all 2008, and July 8, 2010); and Natal, northeast Brazil ($5^{\circ}5'S$; $35^{\circ}1'O$), with two exposures (February 27 and 28, 2009). All the exposures, continuous from 10:00 A.M. to 2:00 P.M., took place only on days with a clear sky. Parallel to DNA biosensor exposure, solar UVB and UVA doses were obtained from the integration of irradiance values measured by continuous UVB/UVA radiometers installed at each location (UVB and UVA Radiometers, EKO Instruments Trading, Tokyo, Tokyo-to, Japan).

DNA Photoproduct Quantification

On defining the average number of DNA photoproducts generated by sunlight at each latitude, the relative amounts of supercoiled and circular

plasmid DNA forms were measured through densitometry analysis, following separation by 0.8% agarose gel electrophoresis (ImageQuant 300, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Samples with 200 ng of DNA were first preincubated with either 0.8 U of Fpg protein (New England Biolabs, Ipswich, MA), 70 ng of T4-endo V (produced in this laboratory), or 250 ng of UVDE (Trevigen, Gaithersburg, MD), so as to discriminate the different types of DNA lesions. They were then incubated for 60 min at 37°C (Fpg and T4-endo V) or 30°C (UVDE). The enzymes, previously tested up to saturation, were used in amounts where no nonspecific cleavage was observed. SSBs induction was also quantified through the same densitometry analysis, although without pretreatment with DNA repair enzymes. The number of enzyme-sensitive sites and SSBs per kbp of plasmid DNA was calculated, assuming Poisson distribution adapted to this technique, as previously described [Schuch et al., 2009].

Identification of CPDs and 6-4PPs by Immunoblot Assays

The formation of CPDs and 6-4PPs was also measured immunologically, as follows. A total of 200 ng of pCMUT vector previously exposed to sunlight was mixed with 800 ng of salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), boiled for 10 min at 100°C, immediately transferred to ice, and then spotted onto nitrocellulose membranes (BIO-RAD, Hercules, CA) by using a slot-blot apparatus (Omniphor, San Jose, CA). The membranes were subsequently incubated with 5X SSC (750 mM NaCl; 75 mM sodium citrate) for 15 min at room temperature, dried, also at room temperature, and baked for 2 hr at 80°C. Blocking was carried out in 5% milk diluted in a PBS buffer (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄; pH = 7.6) for 18 hr at 4°C, whereupon the membranes were incubated with anti-CPD and anti-6-4PP primary antibodies (Cosmo Bio, LTDA, Tokyo, Tokyo-to, Japan; diluted 1:2,000 in 5% milk diluted in a PBS buffer) under constant shaking for 3 hr at room temperature. All primary antibodies were removed, and the membranes washed six times (5 min each) with PBST (0.1% of Tween 20 in PBS). The secondary antibody, Antimouse IgG HRP conjugate (R&D Systems, Minneapolis, MN), was diluted 1:2,000 in 5% milk-PBS, and the membranes incubated under constant shaking for 2 hr at room temperature. The secondary antibody was removed by six washes with PBST. Detection of DNA lesions was by adding a chemiluminescence reagent (Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), followed by chemiluminescence detection (ImageQuant 300, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

RESULTS

Applicability of DNA-Dosimeter for Daily-UV Measurements

The main reason for using this biosensor was to determine and quantify the amount of DNA damage induced by sunlight at a specific place during a predetermined exposure period. The DNA damage profile was further defined as the percentage of certain types of induced-DNA lesions. Thus, environmental exposure using the DNA-dosimeter was carried out on a platform situated at the University of São Paulo, São Paulo, Brazil, on July 8, 2010 (winter in the southern Hemisphere) from 7:00 A.M. to 5:00 P.M. Specific UVB/UVA radiometers were also installed in the same locale. Quantification of DNA lesions is shown in Figure 1.

Fig. 1. Quantification of DNA lesions induced by sunlight in São Paulo (23°3'S; 46°4'O – Brazil) during a winter day (July 8, 2010). 'Control' means DNA samples kept at –20°C inside the laboratory. 'Covered samples' means DNA samples exposed to sunlight, but covered with aluminum foil. SSB – single strand breaks; Fpg-SS – Fpg sensitive sites (oxidized DNA bases); T4-endo V-SS – T4-endo V sensitive sites (CPD); UVDE-SS – UVDE sensitive sites (CPD + 6-4PP). The raw numbers are indicated above each type of DNA lesion.

It was clearly shown that temperature (22°C) exerts no influence on DNA lesion induction, since the amount of all types of damage quantified in the covered control (unexposed samples) was very similar to that of DNA lesions observed in the unexposed control kept at –20°C in the laboratory. The daily DNA damage profile observed after exposure was characterized by 2.7% of SSBs, 29.4% of oxidized DNA bases (Fpg-SS), 50.2% of CPDs (T4-endo V-SS), and 17.7% of 6-4PPs (UVDE-SS - T4-endo V-SS). Evaluation of any variation in solar-UV genotoxic impact was through shorter exposures (only 2 hr), on the same day. Data on directly induced DNA photoproducts, as well as solar UVB/UVA doses measured by UV-radiometers, are shown in Figure 2.

Although there was a clear variation in DNA damage induction, according to the time of day of DNA exposure, this biological response was entirely in accordance with the physical data provided by the radiometers, that is, the highest UV doses induced the highest amount of DNA lesions. A summary of DNA damage profile and percentage of UVB/UVA incidence is presented in Table I.

As expected, although very low early in the morning and late in the afternoon, the incidence of UVB light reached a maximum at midday. Accordingly, at the peak there was a decrease in the percentage of single-strand breaks and oxidized DNA bases, and a clear increase in 6-4PPs. Notwithstanding, although the absolute amount of CPDs increased during midday exposure, the relative frequency of this DNA damage remained invariable throughout the day. Thus, the relative frequency of 6-4PPs in the DNA damage profile is concomitant with increased UVB-light incidence. These results indicate the DNA-dosimeter as being a suitable system for measuring variations in the genotoxic impact of sunlight in a specific location.

Fig. 2. Variation in DNA damage during a winter day (July 8, 2010) in São Paulo (23°3'S; 46°4'O – Brazil). Comparison of quantified DNA damage with measurements of solar UVB (black line) and UVA (grey line) doses, following 2-hr sunlight-exposure (23°3'S; 46°4'O – Brazil).

SSB – single strand breaks; Fpg-SS – Fpg sensitive sites (oxidized DNA bases); T4-endo V-SS – T4-endo V sensitive sites (CPD); UVDE-SS – UVDE sensitive sites (CPD + 6-4PP).

TABLE I. DNA Damage and UV Incidence Profiles After Exposure to Sunlight During a Winter Day (July 8, 2010) in São Paulo (23°3'S; 46°4'O—Brazil)

Environmental exposures 07/08/2010	UVB (%)	UVA (%)	SSB (%)	Oxidized DNA bases (%)	CPD (%)	6-4PP (%)
7:00 A.M. to 9:00 A.M.	0.9	99.1	5.7	49.3	43.3	1.7
9:00 A.M. to 11:00 A.M.	1.9	98.1	3.0	30.2	45.6	21.2
11:00 A.M. to 1:00 P.M.	2.3	97.7	2.3	32.2	43.7	21.8
1:00 P.M. to 3:00 P.M.	2.0	98.0	4.0	34.2	46.0	15.8
3:00 P.M. to 5:00 P.M.	1.0	99.0	6.2	44.9	43.5	5.4
Whole day—7:00 A.M. to 5:00 P.M.	1.9	98.1	2.7	29.4	50.2	17.7

UVB/UVA incidence profile was defined as the percentage of both UVB and UVA doses during exposure. Single strand breaks – SSB; oxidized DNA bases – Fpg-SS (Fpg sensitive sites); CPD – T4-endo V-SS (T4-endo V sensitive sites); 6-4PP – UVDE-SS (UVDE sensitive sites) – T4-endo V-SS.

Variations in Solar UVB/UVA Radiation Incidence at Different Latitudes

In-the-field DNA-dosimeter exposures also took place on sunny days at other locations in the southern Hemisphere, namely, Punta Arenas, in the extreme south of Chile (53°1'S; 70°9'O), São Martinho da Serra, south Brazil (29°4'S; 53°8'O), and Natal, northeast Brazil (5°5'S; 35°1'O) and very close to the Equator, all in combination with measurements of solar UVB and UVA radiation doses by continuous UVB/UVA radiometers. Data on solar UVB/UVA doses are presented in Table II, together with the percentages of UVB/UVA incidence, and the maximum temperatures registered during exposure periods, as well as stratospheric ozone concentration data obtained from the Total Ozone Mapping Spectrometer available at NASA's website (http://jwocky.gsfc.nasa.gov/teacher/ozone_overhead_v8.html) [NASA, 2010], for each day of field experiments.

Except for Punta Arenas, where exposures were during the Antarctic spring, due to the concurrent decrease in the

stratospheric ozone layer, no appreciable differences as regards ozone concentration were registered at the other study locations on the stipulated days. Even though ozone depletion in Punta Arenas was the highest on October 6, the radiometers failed to register a clear local increase in incident UVB radiation in comparison to the other 2 days of exposure. Notwithstanding, there was a slight increase in UVA. On the other hand, it is absolutely clear that the increase in UVB doses is directly dependent on the decrease in latitude (Table II). To better illustrate this, ratios between the averages of UVB and UVA doses measured during DNA-dosimeter exposures for each location were calculated, with Punta Arenas as reference location for comparison (Fig. 3). As expected, the incidence of UVB radiation increased dramatically according to the decrease in latitude. UVB doses reached 1.9-, 5.3-, and 12.1-fold higher in São Martinho da Serra, São Paulo and Natal, respectively, than in the reference location. Interestingly, this appreciable increase was not observed for UVA doses, that is, only 1.3- and 2.3-fold higher in São

TABLE II. Measurements of Solar UVB and UVA Doses, Percentage of UVB/UVA Incidence, Stratospheric Ozone Concentration, and Maximum Temperature During Exposure of DNA-Dosimeter to Sunlight at Different Latitudes

Environmental exposures	10:00 A.M. to 2:00 P.M. UVB (kJ/m ²) 280–315 nm	10:00 A.M. to 2:00 P.M. UVA (kJ/m ²) 315–400 nm	(%) UVB/UVA incidence	Stratospheric ozone concentration (DU)	Maximum temperature (°C)
10/06/2008 (53°1'S)	2.9	401	0.7/99.3	222	10
10/08/2008 (53°1'S)	2.7	362	0.7/99.3	246	12
10/09/2008 (53°1'S)	2.3	357	0.6/99.4	303	11
12/27/2006 (29°4'S)	5.2	191	2.6/97.4	268	23
12/29/2006 (29°4'S)	4.8	177	2.6/97.4	267	26
01/04/2007 (29°4'S)	2.3	81	2.7/97.3	246	24
04/25/2008 (23°3'S)	14.6	518	2.7/97.3	246	27
06/03/2008 (23°3'S)	10.2	397	2.5/97.5	247	17
07/01/2008 (23°3'S)	8.0	341	2.3/97.7	255	18
07/21/2008 (23°3'S)	9.3	357	2.5/97.5	243	20
08/18/2008 (23°3'S)	11.8	443	2.6/97.4	255	25
12/05/2008 (23°3'S)	23.7	780	3.0/97.0	259	29
12/08/2008 (23°3'S)	19.4	625	3.0/97.0	276	27
02/27/2009 (5°5'S)	32.5	867	3.7/96.3	253	39
02/28/2009 (5°5'S)	31.5	819	3.7/96.3	256	36

Fig. 3. Ratio between averages of UVB and UVA doses at each latitude, considering averages of UVB and UVA doses observed at Punta Arenas (53°1'S), as a pattern for comparison. The data represent the average of all measurements taken in each location.

Paulo and Natal, respectively, compared to Punta Arenas. Curiously, UVA doses observed in São Martinho da Serra were lower than those measured in Punta Arenas. There is no reasonable explanation for this observed effect, although there could have been a calibration problem in the UVA radiometer. Nonetheless, and worthy of note: operation of the UVB and UVA radiometers installed in each site is checked twice a year (February and August).

Variations in the DNA Damage Profiles at Different Latitudes

Following environmental exposure at each location, DNA samples were treated with the DNA repair enzymes Fpg, T4-endo V, and UVDE, in order to quantify the amount of specific DNA lesions induced by natural sunlight. Sample analysis through electrophoretic migration in agarose gels was to discriminate supercoiled DNA (form I) from either open-circular relaxed DNA present-

ing breaks or nicks caused by enzymatic cleavage (form II), or direct SSBs that had been discriminated without pretreatment with enzymes. The illustration in Figure 4 refers to experiments for defining DNA photoproducts resulting from exposures in Punta Arenas (53°1'S), São Paulo (23°3'S), and Natal (5°5'S), since data on exposures carried out in São Martinho da Serra (29°4'S) had already been published [Schuch et al., 2009].

The presence of DNA form II only in samples exposed to sunlight was a clear indication of the noninvolvement of environmental temperature in DNA lesion induction. In order to qualify and better evaluate the genotoxic impact of sunlight at these different latitudes, the averages of DNA damage profiles obtained from overall local exposure were calculated (Fig. 5).

As presented in Figure 5, any increase in latitude is accompanied by a corresponding increase in the induction of both oxidized DNA bases and SSBs, followed by a decrease in the formation of 6-4PPs. On the other hand, a decrease in latitude favors the formation of pyrimidine dimers in relation to oxidized DNA bases. Worthy of note, although the absolute amount of CPD varied among locales, their induction profiles were similar in the various locations, thereby indicating the facile generation of this type of DNA damage by sunlight at any latitude.

Furthermore, even though exposures in São Paulo took place in different seasons throughout the year of 2008, there was little change in DNA damage profiles observed at this latitude (Fig. 5), although the absolute amount of DNA lesions (breaks/kbp) can vary among exposures undertaken at different dates, with higher induction in late spring, when compared with fall and winter (Supporting Information, Fig. 1S). Interestingly, this correlates well with the variation of UVA and UVB incidence in São Paulo (Table II). Unfortunately, the high frequency of rainfall during the summer in São Paulo, made it impossi-

Fig. 4. Representative example of experiments for defining DNA lesions after environmental exposures of the DNA-dosimeter in the cities of Punta Arenas (53°1'S; 70°9'O – Chile), São Paulo (23°3'S; 46°4'O – Brazil), and Natal (5°5'S; 35°1'O – Brazil).

ble to carry out continuous experiments (10:00 A.M. to 2:00 P.M.) during this season and at this location, due to the cloudy conditions at this time of day.

Confirming the Induction of CPDs and 6-4PPs by Immunoblot Assays

Confirmatory experiments for detecting CPDs and 6-4PPs induction, using the DNA repair enzymes T4-endo V and UVDE, were carried out with specific antibodies

Fig. 5. Determination of DNA damage profiles after exposure of sunlight at different latitudes. These profiles were defined as the average and standard deviation in percentage of each type of sunlight-induced DNA lesion at each studied location. SSB – single strand breaks; oxidized DNA bases – Fpg-SS (Fpg sensitive sites); CPD – T4-endo V-SS (T4-endo V sensitive sites); 6-4PP – UVDE-SS - T4-endo V-SS (UVDE sensitive sites). The data represent the average of all measurements taken in each location.

for these DNA lesions. Figures 6 and 7 present the results of CPDs and 6-4PPs detection, respectively, for the exposures performed in Punta Arenas (53°1'S), São Paulo (23°3'S), and Natal (5°5'S). Data on exposures in São Martinho da Serra (29°4'S) had already been published [Schuch et al., 2009].

These results basically confirm the induction of both CPDs and 6-4PPs by sunlight at the latitudes investigated. Surprisingly, 6-4PPs induction proved to be much higher at the lowest latitude (5°5' S), when compared to the others. Notwithstanding, an analogous large difference was not observed for CPDs induction, notably less heterogeneous among the various locations. Hence, besides added support to the idea that sunlight genotoxicity changes according to geographic location, there is every indication that 6-4PPs are apparently a form of biomolecular marker of the amount of UVB radiation that reaches the ground at a specific place.

DISCUSSION

In general, a biosensor integrates incident UV wavelengths of sunlight, thereby weighting them according to their biological effectiveness. Thus, considering that one of the most important criteria for biosensor validity is the relevance of pertinent photobiological/photochemical effects, DNA-based biological dosimeters have a genuine biological appeal [Berces et al., 1999]. In this sense, our group developed an environmentally suitable DNA-dosimeter system, based on the exposure of a plasmid DNA solution to artificial UV lamps and sunlight [Schuch et al., 2009; Schuch and Menck, 2010]. Currently, the application of this system has focused on evaluating the genotoxic effects of solar UVB and UVA radiation directly within

Fig. 6. Immunological detection (A) and quantification of CPD antibody signals (B) in DNA samples exposed to sunlight in São Paulo (23°3'S), Punta Arenas (53°1'S), and Natal (5°5'S). The intensity of chemiluminescent signals were measured through densitometry analysis and quantified as folds in relation to unexposed control samples for each exposure to sunlight. Dates are indicated as month/day/year.

the environment. Furthermore, through the use of solar UVB/UVA radiometers, it becomes possible to compare biological responses with the physical data of solar UVB/UVA radiation incidence at various geographic locations.

In a daylong field-experiment carried out in São Paulo (July 8, 2010), the quantification of DNA damage indicated the effective induction of CPDs, 6-4PPs, and oxidized DNA bases, the three major types of DNA lesions caused by sunlight (Fig. 1). On comparing these biological data with physical UV doses provided by UVB/UVA radiometers, there were clear indications of the usefulness of this DNA-based dosimeter for evaluating variations in the daily genotoxic impact of solar UV radiation observed at a specific location (Fig. 2). Furthermore, so as to better demonstrate the environmental applicability of this biological system, following each daily short exposure, the profiles of DNA damage and UV incidence were defined and compared (Table I). It was clearly evident that both profiles undergo changes throughout the day, the induction of pyrimidine dimers (T4-endo V-SS and UVDE-SS) favorably occurring around midday (when UVB incidence is the

highest), whereas this is so with oxidized DNA bases (Fpg-SS) and single strand breaks (SSBs) in the first and last hours of sunlight (when UVB incidence is lower).

Environmental exposures of the DNA-dosimeter were extended to Punta Arenas (Chile), São Martinho da Serra (Brazil), and Natal (Brazil), in order to compare the profiles of DNA damage and UVB/UVA incidence with those observed in São Paulo (Brazil). Since exposure only took place on sunny days, this limited the number of experiments according to the possibility of remaining in each town (Table II). Importantly, although there was a strong variation in the environmental temperatures during the different exposures, DNA lesions were not significantly detected in control samples, indicating that there was no direct effect of temperature on the DNA damage profiles.

In Punta Arenas, on the first day, there was a strong reduction of concentration in the ozone layer (October 6, 2008), on the second, a lesser reduction (October 8, 2008), and on the third, normal ozone concentration (October 9, 2008). Although UV doses were slightly higher on days with less ozone, no expressive increase in

Fig. 7. Immunological detection (A) and quantification of 6-4PP antibody signals (B) in DNA samples exposed to sunlight in São Paulo (23°3'S), Punta Arenas (53°1'S), and Natal (5°5'S). The intensity of chemioluminescent signals were measured through densitometry analysis and quantified as folds in relation to unexposed control samples for each exposure to sunlight. Dates are indicated as month/day/year.

UVB levels was detected on the first day, compared with the others, probably due to the naturally low incidence of UVB wavelengths at this latitude. On the other hand, there was no large difference among the levels of ozone concentration at the Brazilian locations (Table II).

On comparing the averages of total UVB/UVA doses measured at each location in relation to Punta Arenas, it was clear that, although UVB doses inversely increased dramatically with decreases in latitude, this was not so for UVA doses, where increases were only slight (Fig. 3). Thus, given the totally different incidence of UV light in each region, it is inferred that sunlight exerts a variable genotoxic pressure on the DNA molecule. With the approach used here, it was clearly demonstrated that sunlight induced different patterns of DNA damage in Punta Arenas (Fpg-SS $\approx$ T4-endo V-SS $\approx$ UVDE-SS), when compared with those in São Paulo (Fpg-SS < T4-endo V-SS < UVDE-SS) and Natal (Fpg-SS $\ll$ T4-endo V-SS < UVDE-SS) (Fig. 4).

A better qualification of these environmental experiments is given by comparing the averages of the profiles of DNA damage among all the studied latitudes (Fig. 5). These results indicate a certain tendency, when the induction of oxidized DNA bases and SSBs is directly dependent on an increase in latitude, whereas the induction of 6-4PPs is inversely dependent. Moreover, the profiles of DNA damage and UV incidence verified in Punta Arenas (Fig. 5) were very similar to those observed in early morning and late afternoon exposures to sunlight, which took place in São Paulo on July 8, 2010 (Table I).

Finally, the detection of both CPDs and 6-4PPs by immunoblot assays was efficient, and basically confirmed the formation of these DNA lesions after exposure to natural sunlight (Figs. 6 and 7). Furthermore, these results demonstrate the induction of 6-4PPs was much higher near the Equator compared to the other latitudes, whereas the induction of CPDs was less heterogeneous throughout the different locations. Therefore, it is inferred that 6-4PP

is a form of biomolecular marker of local incident UVB radiation.

Thus, the DNA-dosimeter has proved to be a very useful system for evaluating the amount and chemical nature of various types of sunlight-induced DNA lesions. The further application of this biosensor in combination with other physical and meteorological tools should help in improving knowledge regarding interactions between climate change and solar UV radiation, in order to reveal the importance of the influence of sunlight on DNA molecule and living organisms.

REFERENCES

- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM. 2004. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4954–4959.
- Andrady AL, Hamid HS, Torikai A. 2007. Effects of stratospheric ozone depletion and climate change on materials damage. *Photochem Photobiol Sci* 6:311–318.
- Berces A, Fekete A, Gaspar S, Grof P, Rettberg P, Horneck G, Ronto G. 1999. Biological UV dosimeters in the assessment of the biological hazard from environmental radiation. *J Photochem Photobiol B* 53:36–43.
- Caldwell MM, Bornman JF, Ballare CL, Flint SD, Kulandaivelu G. 2007. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobiol Sci* 6:252–266.
- Dahle J, Brunborg G, Svendsrud DH, Stokke T, Kvam E. 2008. Overexpression of human OGG1 in mammalian cells decreases ultraviolet A induced mutagenesis. *Cancer Lett* 267:18–25.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640–6645.
- Dunn J, Potter M, Rees A, Runger TM. 2006. Activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway and recombination repair in the cellular response to solar ultraviolet light. *Cancer Res* 66:11140–11147.
- Kozmin S, Slezak G, Reynaud-Angelin A, Elie C, de Rycke Y, Boiteux S, Sage E. 2005. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13538–13543.
- McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Bjorn LO, Ilyas M. 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci* 6:218–231.
- NASA. 2010. Total Ozone Mapping Spectrometer. Ozone Processing Team—NASA/GSFC Code 613.3.
- Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E. 2000. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem* 275:26732–26742.
- Piette J, Merville-Louis MP, Decuyper J. 1986. Damages induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem Photobiol* 44:793–802.
- Schuch AP, da Silva Galhardo R, de Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CF. 2009. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol Sci* 8:111–120.
- Schuch AP, Menck CF. 2010. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J Photochem Photobiol B* 99:111–116.
- Takahashi A, Ohnishi T. 2004. 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* 18:255–260.
- UNEP. 2010. Environmental Effects of Ozone Depletion: 2010 Assessment. Interactions of Ozone Depletion and Climate Change. Geneva:United Nations Environment Programme (UNEP).
- Yagura T, Makita K, Yamamoto H, Menck CFM, Schuch AP. 2011. Biological sensors for solar ultraviolet radiation. *Sensors* 11:4277–4294.
- Zepp RG, Erickson DJ, Paul ND, Sulzberger B. 2007. Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. *Photochem Photobiol Sci* 6:286–300.

Accepted by—
W. Morgan