André Passaglia Schuch

**Avaliação da ação genotóxica induzida pela radiação
ultravioleta solar na molécula de DNA**

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

São Paulo

2009

André Passaglia Schuch

**Avaliação da ação genotóxica induzida pela radiação
ultravioleta solar na molécula de DNA**

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

Área de concentração: Biotecnologia

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

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Schuch, André Passaglia.

Avaliação da ação genotóxica induzida pela radiação ultravioleta solar na molécula de DNA. / André Passaglia Schuch. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Carlos Frederico Martins Menck.

Tese (Doutorado) – 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: Evaluation of solar-ultraviolet radiation effects upon DNA molecule.

Descritores: 1. Radiação ultravioleta 2. Radiação solar e terrestre 3. Danos do DNA 4. Dosimetria de DNA 5. Gene *supF* 6. Mutagênese I. Menck, Carlos Frederico Martins II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0225/2009

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

Candidato(a): André Passaglia Schuch.

Título da Tese: Avaliação da ação genotóxica induzida pela radiação ultravioleta solar na molécula de DNA.

Orientador(a): Carlos Frederico Martins Menck.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 350/09 referente ao projeto intitulado: *“Desenvolvimento e aplicação do sistema dosímetro de DNA para a avaliação de ação mutagênica induzida pela radiação ultravioleta solar na molécula de DNA”* sob a responsabilidade de **André Passaglia Schuch**, 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, 17 de novembro de 2009.

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

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

Dedicado aos meus pais, pelo incentivo e dedicação em todas as etapas da minha vida. A minha esposa, pelo seu amor e companheirismo... *Nati, sem você isso tudo não teria a mesma graça!* A minha madrinha Beatriz, que é a minha “segunda mãe”. Ao meu orientador, pelo esforço dispendido comigo e com esse trabalho. A USP e a FAPESP por todas as condições oferecidas para uma excelente formação.

Agradecimentos

Aos amigos e colegas do Laboratório de Reparo de DNA do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pela colaboração e convivência ao longo desses anos.

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

Aos Professores e Funcionários da USP por proporcionar excelentes condições de formação profissional e pessoal aos seus alunos.

Aos colaboradores de outras Instituições:

- Dr. Nelson Jorge Schuch do Centro Regional Sul de Pesquisas Espaciais – CRSPE/INPE/MCT, Santa Maria/RS, Brasil;
- Profa. Dra. Damaris K. Pinheiro e Prof. Dr. Marcelo B. da Rosa da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, Brasil;
- Profa. Dra. Lucymara F. Agnez-Lima da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, Brasil;
- Dr. Hiromasa Yamamoto da Universidade de Takushoku e Dr. Kazuo Makita da Universidade de Rikkyo, Japão;
- Prof. Dr. Ricardo Monreal da Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.

Enfim, agradeço a todos que participaram e ajudaram de diferentes maneiras na elaboração e conclusão desse trabalho.

Muito obrigado por tudo!

Resumo

Schuch AP. Avaliação da ação genotóxica induzida pela radiação ultravioleta solar na molécula de DNA [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Com a redução do ozônio estratosférico global, a radiação ultravioleta (UV) torna-se um importante agente genotóxico ambiental de interesse social. Essa preocupação tem impacto sobretudo em países de clima subtropical e tropical, como o Brasil, onde existe uma intensa exposição da população à luz solar e uma alta incidência de câncer de pele. Nesse projeto, foi desenvolvido um sistema que denominamos Dosímetro de DNA, com o objetivo de avaliar a ação genotóxica da radiação UV solar a partir da produção de lesões na molécula de DNA. Para determinar os diferentes tipos de danos, utilizamos enzimas de reparo de DNA e técnicas bioquímicas com anticorpos específicos. Complementando estas análises, foram ainda realizados ensaios de frequência de mutação e da taxa de inativação biológica de DNA. Através da utilização dessa tecnologia foi possível confirmar a produção de lesões CPDs e 6-4PPs após a irradiação em lâmpadas de UVB e UVA. Outro fator importante foi a maior indução de danos oxidativos que a banda de UVA apresentou em relação à de UVB. Também foram obtidos resultados que comprovam a indução de lesões CPDs e 6-4PPs em células de mamíferos e fibroblastos humanos após a irradiação nestas condições. Exposições ambientais demonstram claramente que a luz solar possui diferentes perfis de indução de lesões de DNA, que variam de acordo com a localidade (latitude) da irradiação, e que fenômenos biológicos como inativação de DNA e mutagenese são diretamente dependentes da presença de fotoprodutos na molécula de DNA e não estão associados aos danos oxidativos. Portanto, o sistema Dosímetro de DNA é capaz de fornecer uma ampla compreensão da ação genotóxica da luz solar e informações inovadoras que poderão ser utilizadas no desenvolvimento de substâncias fotoprotetoras mais eficientes.

Palavras-chave: Radiação Ultravioleta. Radiação Solar e Terrestre. Danos do DNA. Dosimetria de DNA. Gene *supF*. Mutagenese.

Abstract

Schuch AP. Evaluation of solar-ultraviolet radiation effects upon DNA molecule. [PhD Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

In recent years, the increase in environmental levels of solar-UV radiation due to depletion of the stratospheric ozone layer has highlighted serious issues of social concern. This becomes still more dramatic in tropical and subtropical regions, where the intensity of solar radiation is higher. To better understand the impact of the harmful effects of UV radiation upon DNA molecule, we developed a reliable biological monitoring system based on the exposure of plasmid DNA to artificial and natural UV sources. The determination and quantification of different types of UV photoproducts were performed through the use of specific DNA repair enzymes and antibodies. Complementing these analyses, the biological effects of sunlight, as well as artificial UV-radiation, were evaluated through the determination of the DNA inactivation rate and mutagenesis frequency of *supF* gene after replication of *pCMUT* vector in *E.coli* MBL50 strains. Through the application of this technology, we could detect the induction of CPDs and 6-4PPs after exposures to UVB and UVA lamps. Interestingly, the induction of oxidative damages was significantly higher after UVA than UVB radiation. We have also performed similar treatment with DNA repair proficient and deficient cells, and the results confirm the induction of CPDs and 6-4PP after UVB and UVA treatments. Surprisingly, the profiles of induction of DNA damages observed after sunlight exposures have presented variations especially according to the latitude. In addition, our data clearly indicate that the induction of DNA inactivation as well as mutagenesis is directly related to the presence of photoproducts in UV-exposed DNA samples, and suggest that oxidative damages are not related to these biological processes. Therefore, a very suitable system was developed capable of providing a wide comprehension of the biological effects of solar-UV radiation upon the DNA molecule.

Key Words: Ultraviolet Radiation. Terrestrial Solar Radiation. DNA damage. DNA dosimetry. *SupF* gene. Mutagenesis.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação ilustrativa do espectro eletromagnético solar terrestre.....	22
Figura 2: Representação ilustrativa das principais lesões de DNA induzidas pela radiação UV solar.....	26
Figura 3: Modelo simplificado do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) em <i>E. coli</i>	28
Figura 4: Modelo simplificado do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) em células de mamíferos.....	30
Figura 5: Os problemas da exposição solar excessiva para a saúde humana.....	32
Figura 6: Esquema do fenômeno de destruição do ozônio pela ação dos CFCs.....	36
Figura 7: Mapa genético do plasmídeo <i>pCMUT</i>	42
Figura 8: Espectro de irradiância das lâmpadas de UVB e UVA.....	45
Figura 9: Exposição do Dosímetro de DNA à luz solar e os diferentes tipos de lesões de DNA estudadas com a aplicação dessa tecnologia.....	46
Figura 10: Plataforma de monitoramento da radiação UVB e UVA solar instalada no ICB-II, Campus da USP, cidade de São Paulo – SP.....	47
Figura 11: Esquema simplificado da técnica de interrupção gênica em <i>E. coli</i>	52
Figura 12: Esquema geral do método de seleção positiva de mutações no gene <i>supF</i>	55
Figura 13: Indução de lesões de DNA após exposições de amostras de DNA plasmidial à radiação UVC, UVB e UVA.....	59
Figura 14: Taxa de inativação de DNA e frequência de mutação após exposições à radiação UVC, UVB e UVA e replicação do vetor <i>pCMUT</i> na linhagem de <i>E. coli</i> <i>MBL50</i>	60
Figura 15: Espectros de transmitância do acrílico PMMA e do elastômero Sylgard 184.....	61
Figura 16: Modelos utilizados como sistema de exposição de DNA.....	62
Figura 17: Nova forma de apresentação do sistema de exposição de DNA.....	63
Figura 18: Exemplo representativo da determinação de fotolesões após exposições de amostras de DNA plasmidial no sistema Dosímetro de DNA à luz UVB e UVA.....	64

Figura 19: Quantificação das fotolesões de DNA após exposições às lâmpadas de UVB e UVA.....	65
Figura 20: Comparação dos perfis de lesões de DNA induzidos por luz UVA entre amostras de DNA plasmidial purificadas através da metodologia de extração por gradiente de cloreto de cério ou pelo Quiagen maxi kit.....	67
Figura 21: Análise da contribuição dos sítios AP em relação aos demais fotoprodutos.....	68
Figura 22: Detecção imunológica de lesões CPD e 6-4PP em amostras de DNA plasmidial expostas à luz UVB e UVA.....	69
Figura 23: Detecção de sítios AP e 6-4PP por tratamento alcalino das amostras de DNA plasmidial expostas à luz UVA.....	71
Figura 24: Detecção imunológica de lesões de DNA após a exposição de culturas de células CHO9 às radiações UVB e UVA.....	72
Figura 25: Detecção imunológica de lesões de DNA após exposição de células MRC5 e XP12RO às radiações UVB e UVA.....	73
Figura 26: Indução de lesões de DNA após exposições ambientais do Dosímetro de DNA no OES.....	75
Figura 27: Detecção imunológica de lesões de DNA nas amostras expostas à radiação UVA, UVB e luz solar.....	76
Figura 28: Determinação da taxa de inativação de DNA e frequência de mutação após exposições de amostras de DNA plasmidial à luz solar no OES.....	77
Figura 29: Contribuição das lesões de DNA na indução de inativação de DNA e mutagenese na linhagem de <i>E. coli</i> MBL50 após exposições de amostras de DNA plasmidial em lâmpadas de UVC, UVB e UVA, e também expostas à luz solar no OES.....	78
Figura 30: Disrupção do gene <i>uvrA</i> na cepa de <i>E. coli</i> MBL50.....	80
Figura 31: Comparação da sensibilidade de detecção dos efeitos biológicos induzidos pela luz solar na cidade de São Paulo entre as cepas de <i>E. coli</i> MBL50 e MBL50 Δ <i>uvrA</i> (exposição ambiental realizada em 25/04/2008).....	81
Figura 32: Mapa das localidades das exposições ambientais realizadas em diferentes latitudes (indicadas no mapa) do Brasil e da América do Sul.....	83

Figura 33: Exemplo representativo de experimentos de determinação de lesões de DNA após exposições ambientais do Dosímetro de DNA nas cidades de Punta Arenas (53° 1' S), São Paulo (23° 3' S) e Natal (5° 5' S).....	85
Figura 34: Média e desvio padrão das porcentagens de lesões de DNA quantificadas em cada localidade e após tratamentos com lâmpadas de UVB (6 kJ/m ²) e UVA (300 kJ/m ²) no laboratório.....	87
Figura 35: Correlações entre a indução de quebras simples de DNA (SSB) e sítios sensíveis às enzimas Fpg (Fpg-SS), T4-endo V (T4-endo V-SS) e UVDE (UVDE-SS) com as doses de radiação UVB e UVA solar medidas pelos radiômetros, após cada exposição ambiental do Dosímetro de DNA nas diferentes latitudes estudadas.....	88
Figura 36: Confirmação da presença de lesões CPDs e 6-4PPs.....	90
Figura 37: Correlações entre indução de inativação de DNA e frequência de mutação com as doses de radiação UVB e UVA solar.....	92

Lista de Tabelas

Tabela 1: Conjunto de iniciadores utilizados para a deleção do gene <i>uvrA</i> de <i>E. coli</i>	51
Tabela 2: Monitoramento da radiação UVB e UVA solar e temperatura durante os períodos de exposições ambientais do Dosímetro de DNA no Observatório Espacial do Sul – OES, RS, Brasil.....	75
Tabela 3: Medidas de radiação UVB/UVA solar e temperatura máxima durante as exposições ambientais do Dosímetro de DNA.....	84
Tabela 4: Perfis de indução de lesões de DNA determinados após a realização de exposições ambientais do Dosímetro de DNA em diferentes latitudes do Brasil e da América do Sul e em condições controladas dentro do laboratório (lâmpadas de UVB e UVA).....	86
Tabela 5: Determinação da taxa de inativação de DNA e da frequência de mutação após a realização das exposições ambientais em todas as latitudes estudadas.....	91

Lista de Abreviaturas e Siglas

6-4PP: 6-4 pirimidina-pirimidona fotoprodutos

8-oxoG: 7,8-dihidro-8-oxiguanina

A, C, T, G: adenina, citosina, timina, guanina

amp: gene de resistência à ampicilina

Anti-6-4PP: anticorpo primário específico para a lesão de DNA 6-4PP

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

bp: pares de bases

B. subtilis: *Bacillus subtilis*

cat: gene de resistência à cloranfenicol

CFCs: clorofluorcarbonos

CHO9: células de ovário de hamster chinês

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

CS: síndrome de Cockayne

DewarPP: fotoproduto isômero de Dewar

D.O.: densidade óptica

DMEM: meio Eagle modificado por Dubelcco

DNA: ácido desoxirribonucléico

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

dNTPs: 2'-deoxinucleotídeos-5'-trifosfatos

EDTA: ácido etilenodiamino teracético

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

FRT: sequências repetidas que flanqueiam o gene

GG-NER: reparo do genoma global

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IG: região do fago M13 que permite obtenção de DNA simples fita

IPTG: isopropil-beta-D-thiogalactopiranosídeo

kbp: quilobases de DNA

MRC5: fibroblastos humanos proficientes em reparo de DNA

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

Nfo: endonuclease IV de *E. coli*

Nfo-SS: sítios sensíveis à enzima Nfo

OES-CRS-INPE/MCT: Observatório Espacial do Sul – Centro Regional Sul – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/Ministério da Ciência e Tecnologia

ori: origem de replicação bacteriana

OriSV: origem de replicação de SV40

PBS: tampão fosfato salino

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

PCR: reação de polimerase em cadeia

PMMA: acrílico polimetilmetacrilato

RF: fator de redução (reduction factor)

rpm: rotações por minuto

RNA: ácido ribonucléico

sítios AP: sítios apurínicos-apirimidínicos (abásicos)

SSB: quebras simples de DNA (*single strand breaks*)

STM^R: resistência à estreptomicina

supF: gene alvo para mutagênese

SV40: *Simian virus 40*

T4-endo V: T4 endonuclease V

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

TC-NER: reparo acoplado à transcrição

TET^R: resistência à tetraciclina

tRNA: RNA transportador

T, t: genes de antígenos de SV40

UFC/μg: unidades formadoras de colônias por micrograma

UV: radiação ultravioleta

UVA: radiação ultravioleta A

UVB: radiação ultravioleta B

UVC: radiação ultravioleta C

UVDE: *Ultraviolet damage endonuclease*

UVDE-SS: sítios sensíveis à enzima UVDE

XP: xeroderma pigmentosum

XP12RO: fibroblastos humanos deficientes em reparo de DNA

Sumário

1	Introdução.....	19
1.1	Radiação ultravioleta (UV) solar e a evolução da vida na Terra.....	19
1.2	A relevância biológica da radiação UV solar: a ação sobre a molécula de DNA.....	21
1.3	A remoção dos fotoprodutos do genoma: a importância do Reparo por Excisão de Nucleótidos.....	27
1.4	Contextualização dos problemas da exposição excessiva à luz solar.....	31
1.5	O esforço mundial para o monitoramento dos efeitos biológicos da radiação UV solar.....	35
2	Objetivos.....	40
3	Materiais e Métodos.....	41
3.1	Linhagens bacterianas e plasmídeo.....	41
3.2	Construção do vetor plasmidial <i>pCMUT</i>.....	41
3.3	Construção de bactérias eletro-competentes.....	42
3.4	Transformação de bactérias eletro-competentes por eletroporação.....	43
3.5	Irradiação de amostras de DNA plasmidial a fontes artificiais de radiação UV: etapa preliminar ao desenvolvimento do Dosímetro de DNA.....	44
3.6	Exposições do Dosímetro de DNA a fontes artificiais de radiação UV e à luz solar natural.....	45
3.7	Quantificação de lesões no DNA exposto à luz UV através da utilização de enzimas de reparo de DNA (T4-endo V, Fpg e UVDE).....	47
3.8	Preparação da enzima T4-endonuclease V.....	48
3.9	Identificação de sítios abásicos (sítios AP) e 6-4PPs por tratamento alcalino.....	49
3.10	Detecção de lesões CPDs e 6-4PPs por ensaios de Imuno “<i>slot-blot</i>”.....	50
3.11	Obtenção de cepas de <i>E. coli</i> <i>MBL50</i> mais sensíveis à radiação UV mutadas para genes de reparo de DNA.....	51
3.11.1	Experimento de curva de sobrevivência após exposição à radiação UVC: comparação entre as sensibilidades das cepas <i>MBL50</i> e <i>MBL50</i>Δ<i>uvrA</i>.....	52

3.11.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR).....	53
3.12 Ensaio de frequência de mutação através do método de seleção positiva de mutações no gene <i>supF</i>	54
3.13 Cálculo da taxa de inativação biológica de DNA.....	56
3.14 Cultura celular.....	56
3.15 Sub-cultivo de células.....	56
3.16 Irradiação de culturas de células com luz UVB e UVA e extração de DNA genômico.....	57
4 Resultados.....	58
4.1 Danos de DNA e efeitos genotóxicos induzidos por fontes artificiais de radiação UV: etapa preliminar ao desenvolvimento do Dosímetro de DNA.....	58
4.2 Desenvolvimento de um sistema de exposição de DNA à luz solar – a evolução do Dosímetro de DNA.....	61
4.3 Quantificação das lesões de DNA induzidas por lâmpadas de UVB e UVA: utilização do sistema Dosímetro de DNA.....	63
4.4 Avaliação do efeito de possíveis contaminantes do processo de extração de DNA na indução de danos pela radiação UVA: aplicação do sistema Dosímetro de DNA.....	66
4.5 Análise da contribuição de sítios abásicos (sítios AP) na indução dos sítios sensíveis à UVDE após exposição à radiação UVA: aplicação do sistema Dosímetro de DNA.....	68
4.6 Detecção de fotoprodutos de DNA com anticorpos específicos (anti-CPD e anti-6-4PP): aplicação do sistema Dosímetro de DNA.....	69
4.7 Identificação da indução de sítios abásicos (sítios AP) e 6-4PPs pela radiação UVA após tratamento alcalino: aplicação do sistema Dosímetro de DNA.....	70
4.8 Detecção de lesões CPDs e 6-4PPs com o uso de anticorpos específicos após exposições de culturas de células às lâmpadas de UVB e UVA.....	71
4.9 Aplicação do sistema Dosímetro de DNA no monitoramento da radiação UV solar biologicamente ativa.....	74
4.9.1 Danos ao DNA e efeitos genotóxicos induzidos pela luz solar: primeiras exposições ambientais do Dosímetro de DNA (São Martinho da Serra, RS).....	74

4.9.2	Obtenção de cepas de <i>E. coli</i> MBL50 mais sensíveis à UV mutadas para genes de reparo de DNA.....	79
4.9.3	Aplicação ambiental do sistema Dosímetro de DNA: exposições realizadas em diferentes latitudes do Brasil e da América do Sul.....	82
5	Discussão.....	94
6	Conclusão.....	104
	Referências.....	105
	Anexo.....	113

1 Introdução

1.1 Radiação ultravioleta (UV) solar e a evolução da vida na Terra

Há aproximadamente 4 bilhões de anos, a atmosfera terrestre apresentava uma condição anaeróbica, ou seja, com ausência de oxigênio e, conseqüentemente, de ozônio. Portanto, a radiação UV solar exercia uma forte ação seletiva nas formas de vida da Terra primitiva. Sugere-se que, após o surgimento da vida em ambientes aquáticos, as primeiras espécies de organismos encontraram dificuldades extremas para ocupar o ambiente terrestre, principalmente devido às altas doses dos raios UV incidentes na superfície. Sendo assim, os intensos e curtos comprimentos de onda da luz solar deveriam ser especialmente danosos, principalmente quando comparado às condições presentes [1].

A época citada acima compreendia o período Arqueano, que iniciou 700 milhões de anos após a formação da Terra e durou aproximadamente 1,3 bilhões de anos. Durante esse período, principalmente devido às condições atmosféricas, a incidência de radiação UV era significativamente maior e essa diferença física teve importantes conseqüências biológicas, particularmente pelo fato de já existir um ecossistema microbiano nos ambientes aquáticos. Especula-se que a taxa de dano ao DNA na superfície dos oceanos do Arqueano era aproximadamente 3 ordens de magnitude maior do que a existente atualmente (ou seja, 1.000 vezes maior do que a taxa atual), o que dificultava muito a migração da vida para ambientes terrestres. Seguindo o mesmo raciocínio, estima-se que a mesma taxa de dano observada na superfície dos nossos oceanos atualmente era encontrada apenas a 30 metros de profundidade nas condições anteriores. Desta forma, supõe-se que nessa camada de água de 30 metros, deveria existir uma biota resistente à UV e com baixa diversidade, constituída principalmente por microrganismos com capacidades de reparo similares a de *Deinococcus radiodurans* [2].

Porém, com a evolução da vida no nosso planeta, múltiplas estratégias de sobrevivência e mecanismos biológicos surgiram em ordem de minimizar as conseqüências genotóxicas da luz solar, principalmente nos primeiros estágios da vida na Terra. Sabe-se que organismos como as cianobactérias sintetizavam aminoácidos semelhantes à Micosporina (*do inglês, Mycosporine-like amino acids*),

os mais importantes pigmentos absorvedores de UV existentes na época [1]. Outra estratégia de sobrevivência para proteger os organismos dos efeitos danosos da luz solar foi o surgimento de mecanismos de reparo de DNA. O aparecimento e a irradiação desses sistemas entre as formas de vida da época foram cruciais para permitir a ocupação de novos nichos, onde havia maior exposição aos raios UV provenientes do sol [3].

Hoje se sabe que todas as formas de vida possuem vários sistemas que removem lesões no DNA, ou simplesmente auxiliam as células a tolerá-las, nos quais, constituem uma defesa extremamente eficiente que garante a estabilidade do genoma e, conseqüentemente a própria existência da célula e/ou do organismo. Porém, esses sistemas eventualmente falham e quando as lesões de DNA não são reparadas corretamente, essas interferem em processos celulares básicos, como a síntese de DNA e RNA, levando a formação de mutações e morte da célula [4].

Por outro lado, as mudanças (mutações) geradas no fluxo da informação genética propiciam diversidade, fundamental para o processo evolutivo. Desta forma, de acordo com a teoria de Charles Darwin, na qual afirma que “a evolução biológica consiste da geração de variabilidade hereditária e da sobrevivência diferenciada de seus descendentes” [5], e com os fatos supracitados, torna-se óbvio supor que a radiação solar desempenhou um papel fundamental na evolução das espécies no nosso planeta, agindo como um potente agente seletivo ambiental, principalmente nos primeiros estágios da vida.

Com o aumento da diversidade e a ocupação das camadas superficiais dos oceanos, a luz solar começa a desempenhar o seu papel mais importante na evolução: a sua utilização como fonte de energia no processo de fotossíntese. Há aproximadamente 2,7 bilhões de anos, as cianobactérias e a atividade fotossintética surgem e a atmosfera terrestre começa a sofrer uma mudança jamais vista, onde sua composição anaeróbica gradualmente é modificada para aeróbica, devido à liberação de oxigênio como produto desse fenômeno biológico. Acredita-se que essa mudança ambiental foi a principal responsável pela explosão animal do período Cambriano, que teve seu início há aproximadamente 542 milhões de anos [6]. Uma vez que o oxigênio encontrava-se presente na atmosfera, surge outra função crucial da luz solar para a manutenção e evolução da vida na Terra: a formação da molécula de ozônio (O_3) através da desassociação da molécula de oxigênio (O_2)

pela ação dos raios UV. As moléculas de ozônio são constituídas por 3 átomos de oxigênio e, entre altitudes de 10 e 50 km, essas formam a conhecida camada de ozônio, que funciona como um filtro bloqueando os nocivos raios UV de menores comprimentos de onda. Após a formação da camada de ozônio, há aproximadamente 0,4 bilhões de anos, os organismos puderam definitivamente expandir os seus domínios dos ambientes aquáticos para ambientes terrestres [1]. E hoje, na Terra que conhecemos, diferentes espécies de organismos, incluindo o *Homo sapiens*, são capazes de sobreviver lado a lado aproveitando e protegendo-se dos benefícios e malefícios que o sol oferece diariamente.

1.2 A relevância biológica da radiação UV solar: a ação sobre a molécula de DNA

A molécula de DNA é responsável pela manutenção e transmissão da informação genética ao longo das gerações. Portanto, é de fundamental importância que esse patrimônio genético seja protegido. Entretanto, devido a sua constituição físicoquímica, esta é o principal alvo de diversos agentes genotóxicos capazes de alterar a sua estrutura e eventualmente darem origem a mutações que levam a um funcionamento impróprio de funções celulares primordiais [7].

Sem dúvida, entre os agentes ambientais cujos organismos estão expostos, a radiação UV solar merece destaque principal pela sua capacidade de danificar diferentes biomoléculas de diversas formas de vida. Atualmente, a proporção total de radiação UV incidente na superfície terrestre é de 6,1% do espectro eletromagnético solar. A sua maior parte, cerca de 95%, é constituída pela radiação do tipo A (UVA – 315 a 400 nm), a qual atinge o solo sem uma absorção significativa pela atmosfera. Os outros 5%, são constituídos pela radiação do tipo B (UVB – 280 a 315 nm), contudo a redução da camada de ozônio pode levar a mudanças em sua distribuição espectral. O oxigênio e o ozônio absorvem completamente a radiação do tipo C (UVC – <280 nm), portanto esses comprimentos de onda não atingem a superfície terrestre [1, 8]. A Figura 1 mostra uma representação ilustrada do espectro eletromagnético solar.

Figura 1: Representação ilustrativa do espectro eletromagnético solar terrestre.

Embora a radiação UV represente apenas uma pequena parte do espectro solar atual, essa tem uma enorme importância para a estruturação da atmosfera, assim como, exerce um impacto crítico sobre a biosfera [9]. A sua principal relevância biológica consiste na sua capacidade de induzir lesões na molécula de DNA, seu principal alvo de ação em diferentes formas de vidas terrestres e aquáticas [10]. Desta forma, sugere-se que os efeitos danosos da radiação UV estão diretamente associados aos danos produzidos na molécula de DNA que, como já dito anteriormente, podem levar a indução de mutações ou morte celular. Porém, a natureza química e a eficiência de formação de lesões de DNA dependem fortemente do comprimento de onda dos fótons incidentes nas células [11].

Sendo assim, quando amostras biológicas são irradiadas com luz UV ocorre a formação de diversos tipos de lesões de DNA, nas quais possuem diferentes propriedades mutagênicas. A absorção dos fótons de menores comprimentos de

onda, referentes às bandas de UVC e UVB, pelas bases nitrogenadas do DNA resulta principalmente em reações de dimerização entre bases de pirimidina que são adjacentes. Consequentemente, diversos tipos de lesões são produzidas, incluindo os dímeros de pirimidina *Cis-syn*-ciclobutano (CPDs) e os 6-4 pirimidina-pirimidona fotoprodutos (6-4PPs), que são as lesões de DNA mais frequentes [12]. Os CPDs são formados por ligações covalentes entre os carbonos 5 e 6 de duas pirimidinas adjacentes, formando-se assim um anel ciclobutano. Já os 6-4PPs são caracterizados por uma ligação covalente entre os carbonos 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas. É importante destacar que a energia dos fótons de UVB é alta o suficiente para formar esses tipos de lesões através da sua absorção direta pelo DNA [8, 13-15]. Esses fotoprodutos são capazes de gerar mutações típicas, caracterizadas por transições C – T. Essas transições também incluem mutações CC – TT em sequência [16].

Os fotoprodutos de UV supracitados resultam da direta absorção de fótons pelas bases do DNA, mas a radiação UV também pode induzir danos no DNA de forma indireta [17]. Desta forma, após a absorção dos raios UV por outros cromóforos celulares, a energia pode ser transferida para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que tem capacidade de danificar a molécula de DNA. De fato, as EROs induzidas por UV incluem o oxigênio singlete, o radical superóxido e, provavelmente, outra espécie não-radicalar como o peróxido de hidrogênio [18]. Até mesmo os nocivos radicais hidroxilas, que são altamente reativos, podem ser formados por uma reação do peróxido de hidrogênio com metais ligados ao DNA, através da Reação de Fenton [8]. Esses radicais interagem preferencialmente com a base guanina, gerando diversas alterações morfológicas na molécula de DNA, dentre as quais, a bem estudada 7,8-dihidro-8-oxiguanina (8-oxoG) recebe destaque principal. Essa lesão de DNA é conhecida por resultar em mutações do tipo transversões G – T através do erro de pareamento da 8-oxoG com a adenina, ou transversões A – C pela incorporação inapropriada da 8-oxoG oposta a uma adenina [19, 20].

A indução de danos oxidativos na molécula de DNA é mais eficiente pelos comprimentos de onda de UVA [21]. A oxidação de bases também é indicada como um tipo de lesão mutagênica, onde a sua produção indireta via EROs é sugerida como a base da mutagenese e carcinogênese em estudos com luz UVA [22]. Esse

fato se fortalece devido à baixa absorção dos fótons de UVA pela molécula de DNA. Portanto, torna-se evidente que a eficiência de produção de fotoprodutos por UVA seja significativamente menor quando comparada às bandas de UVB e UVC [8]. Justamente por essa conjunção de fatores, acredita-se que a indução de bases oxidadas, após a irradiação de DNA e de culturas de células com luz UVA, seja o principal tipo de lesão formada por esses comprimentos de onda [23].

Mas, com o avanço das tecnologias de detecção de danos na molécula de DNA e de exposição de amostras biológicas a essas fontes artificiais de radiação UV, pesquisas recentes com culturas de células e com amostras de pele humana desafiam a hipótese de que os danos de DNA induzidos por UVA sejam mediados principalmente por estresse oxidativo, mostrando que as lesões CPDs, são geradas com mais eficiência e possuem maior relevância biológica do que os danos oxidativos [11, 24]. Adicionalmente, tem sido demonstrado também que apenas uma pequena fração das mutações induzidas por UVA são tipicamente originadas a partir de danos oxidativos [22]. Em estudos com culturas de células de fibroblastos humanos, as mutações induzidas tanto por UVB quanto por UVA foram muito semelhantes, com uma predominância de transições C – T em sítios que continham dímeros de pirimidinas e havendo uma predominância dessas mutações na fita de DNA não-transcrita, o que dá suporte a idéia de que os fotoprodutos de UV são as lesões de DNA mais mutagênicas, não apenas para UVB como também para UVA [25].

Embora a indução de 6-4PPs pela luz UVA tenha sido descrita como indetectável [11, 15, 24, 26], comprimentos de onda próximos aos 320 nm são capazes de induzir a sua fotoisomerização em fotoprodutos de Dewar (DewarPPs) [11, 27, 28]. Porém, um trabalho recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstra claramente, por diferentes técnicas de detecção, a formação de 6-4PPs e/ou DewarPPs após a irradiação de amostras de DNA com luz UVA, indicando um novo perfil de lesões de DNA induzido por esses comprimentos de onda [21].

Outro tipo de lesão de DNA induzida por luz UV são as quebras simples de DNA (SSB – *do inglês, single strand breaks*). Essa classe de dano de DNA é rápida e eficientemente reparada, o que indica que as SSBs devem ter uma participação muito pequena ou nula em eventos de mutagênese. O que é muito diferente de quando são geradas quebras duplas de DNA (DSB – *do inglês, double strand*

breaks), mas existem evidências suficientes mostrando que as DSBs não são eficientemente formadas pela luz UV [21, 29].

Dentre todas as lesões que são formadas no DNA após exposição à radiação solar, os fotoprodutos de bupirimidinas possuem a maior relevância biológica, sendo os CPDs considerados os mais importantes devido à sua abundância relativa, pelo seu reparo mais lento e pela sua mutagenicidade conhecida. Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de CPDs em diferentes processos celulares, tais como: mutagênese, apoptose e carcinogênese [30-33]. Entretanto, o impacto biológico das lesões 6-4PPs ainda é questionável. Sugere-se que esse tipo de lesão possa ter uma importância tão grande quanto CPDs em termos de indução de mutações após a exposição de amostras biológicas a simuladores solar [26]. Também foi demonstrado que o foto-reparo dessa lesão de DNA, exercido pela enzima 6-4PP-fotoliase, reduziu os níveis de apoptose em células humanas deficientes em reparo de DNA [33]. Complementando essa resposta, o foto-reparo de ambas as lesões, pelo uso das enzimas CPD-fotoliase e 6-4PP-fotoliase, resultou em valores de apoptose similares aos verificados nas células controles não-irradiadas [33]. Em relação aos DewarPPs, esses fotoprodutos são reparados do genoma de células de mamíferos com uma cinética e eficiência similares a do reparo de CPDs. Essa similaridade observada sugere que os DewarPPs podem contribuir significativamente na mutagênese que ocorre após a exposição à luz solar [27]. Uma representação ilustrativa das principais lesões de DNA induzidas pela radiação UV solar é apresentada na Figura 2.

Figura 2: Representação ilustrativa das principais lesões de DNA induzidas pela radiação UV solar. Os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e os 6-4 fotoprodutos (6-4PPs) são formados diretamente pela absorção dos raios UV pelo DNA. A formação dos isômeros de Dewar (DewarPPs) é dependente da fotoisomerização da lesão 6-4PP pela absorção de fótons com comprimentos de onda próximos aos 320 nm. Os maiores comprimentos de onda da radiação UV solar (banda de UVA) são mais eficientes para induzir a lesão 7,8-dihidro-8-oxiguanina (8-oxoG), considerada um marcador clássico de danos oxidativos na molécula de DNA.

1.3 A remoção dos fotoprodutos do genoma: a importância do Reparo por Excisão de Nucleotídeos

A radiação UV gera principalmente dímeros de pirimidina no DNA das células. A remoção dessas lesões do genoma é feita principalmente pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (*NER* – do inglês, *nucleotide excision repair*), que é muito similar entre organismos procariontes e eucariontes, embora, as proteínas que atuam nesse sistema não sejam conservadas. Na verdade, a *Escherichia coli* foi originalmente a espécie mais estudada e ainda é a mais conhecida em relação a *NER*, servindo como modelo para a elucidação dessa via de reparo em outros organismos, inclusive no homem.

O sinal principal para a ativação de genes de reparo de DNA em bactérias se dá através da formação de lesões no DNA, que levam a formação de DNA de fita simples, o que acaba resultando na interrupção da replicação. Na tentativa de sobreviver aos efeitos letais das lesões provocadas no DNA, um grande número de genes é ativado por um elegante mecanismo conhecido como sistema SOS [34]. A ativação da expressão de genes pela resposta SOS provoca alterações em diferentes tipos de respostas fisiológicas, tais como: a inibição do ciclo celular e ativação de diversos sistemas de reparo de DNA, como o *NER*, o reparo recombinacional (gene *recA*) e o reparo sujeito a erro por meio da síntese de translesão (genes *umuC* e *umuD*) [35].

O sistema *NER* de *E. coli* consiste basicamente de seis genes estruturais (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *polA* e *lig*). O primeiro passo nesse mecanismo é o reconhecimento da lesão pelo complexo *UvrA₂B*. Em seguida, ocorre a dissociação desse complexo protéico de modo a permitir a saída de *UvrA₂* e permanência de *UvrB*. Então, a endonuclease *UvrC* é recrutada, a qual se complexa com a *UvrB*. A fita de DNA contendo a lesão é clivada em dois pontos: no 4° ou 5° nucleotídeo a 3' da lesão e no 7° nucleotídeo a 5' da mesma. Os sítios catalíticos para as incisões 3' e 5' se encontram na endonuclease *UvrC*. A *UvrD* é uma helicase que auxilia no desenrolamento do DNA para permitir a liberação da fita simples originada pelas duas incisões. Após a excisão do fragmento contendo a lesão, a DNA polimerase I faz a síntese do DNA e a DNA ligase finaliza o reparo [36, 37]. Um esquema simplificado desse sistema de reparo de DNA é apresentado na Figura 3.

Figura 3: Modelo simplificado do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) em *E. coli*.

Em humanos, a importância do NER é evidenciada pela existência de doenças que levam a uma extrema sensibilidade à luz solar. De fato, a descoberta de que pacientes com a síndrome *xeroderma pigmentosum* (XP) apresentam deficiências no reparo de DNA, foi a primeira indicação da importância desse sistema em seres humanos [38]. Além do estudo dessa doença, outra síndrome autossômica recessiva rara, chamada de Síndrome de Cockayne (CS), também forneceu importantes informações sobre essa via de reparo em humanos. Os indivíduos afetados por essas síndromes apresentam uma hipersensibilidade à luz solar. Ambas as doenças são geneticamente heterogêneas, das quais XP é causada por mutações em 1 entre 7 genes, incluindo mais um gene variante (XPA até XPG, e mais o XPV) e CS é causada pelo defeito em dois genes (CSA ou CSB). Os

produtos dos genes XP são conhecidos por desempenharem várias funções durante o reconhecimento do dano e na incisão do DNA lesado [39]. Por outro lado, os produtos dos genes CS são requeridos no reparo de genes que são ativamente transcritos [40]. No geral, esses indivíduos apresentam alta frequência de tumores de pele em regiões expostas à luz solar, degeneração neurológica progressiva e envelhecimento prematuro [41]. As células desses indivíduos apresentam alta taxa de mutação quando irradiadas com luz UV. Essa alta mutabilidade está diretamente associada à formação de tumores, evidência direta da correlação entre mutação e câncer.

O sistema NER repara um amplo espectro de lesões de DNA capazes de causar distorções na dupla hélice e/ou a sua modificação química, através da remoção de um fragmento de nucleotídeos da fita que contém a lesão [42]. Essa via bioquímica é altamente conservada entre os eucariontes e a sua ação pode ser subdividida em 4 passos: (1) reconhecimento do dano; (2) abertura local do duplex de DNA no sítio da lesão; (3) incisão dupla na fita contendo a lesão; e (4) resíntese do novo fragmento de DNA e sua ligação pela DNA ligase 1 [36, 41, 43, 44]. Na verdade, existem duas formas de NER: o reparo do genoma global (GG-NER), que corrige os danos em áreas transcricionalmente silenciosas do genoma; e o reparo acoplado à transcrição (TC-NER), que repara danos na fita transcrita de genes ativos. Essas duas subvias são fundamentalmente idênticas, exceto pelos seus mecanismos de reconhecimento do dano. No GG-NER, o complexo protéico XPC/HHR23B é responsável pela detecção inicial do dano. Já no TC-NER, XPC não é requerida, mas o reconhecimento é feito pelo bloqueio estérico da maquinaria de transcrição no sítio da lesão. Nesse caso, a RNA polimerase é deslocada em ordem de permitir que as proteínas do NER tenham acesso ao DNA danificado. Esse deslocamento é feito pela ação das proteínas CSA e CSB, assim como outros fatores específicos do TC-NER. Os passos subsequentes dessas vias são essencialmente idênticos.

A proteína XPA junto com a proteína de replicação A (RPA) se ligam ao sítio de DNA contendo a lesão, promovendo o reconhecimento do dano. Em seguida, as helicases XPB e XPD, componentes do fator de transcrição TFIIH, desenrolam a fita de DNA. As endonucleases XPG e ERCC1/XPF clivam a fita de DNA que contém a lesão, em posições 3' e 5' da mesma, gerando um oligonucleotídeo de

aproximadamente 30 pares de bases que contém a lesão. Esse oligonucleotídeo é removido, deixando uma lacuna que precisa ser resintetizada. Essa função é feita pelas DNA polimerases delta e épsilon, assim como, por vários fatores acessórios da replicação. Finalmente, esse novo fragmento é ligado à fita original pela DNA ligase, completando o processo do NER [41, 43, 44]. Um esquema geral do mecanismo de NER em células de mamíferos é apresentado na Figura 4.

Figura 4: Modelo simplificado do Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) em células de mamíferos. O reconhecimento da lesão (1) difere entre o reparo do genoma global (GG-NER) e o reparo acoplado à transcrição (TC-NER). Os passos subsequentes dessa via são idênticos e incluem o desnovelamento local da fita de DNA (2), a dupla incisão (3), e a remoção do oligonucleotídeo contendo a lesão seguida da resíntese desse fragmento e sua ligação (4).

1.4 Contextualização dos problemas da exposição excessiva à luz solar

De fato, a radiação UV solar é um dos mais importantes agentes mutagênicos ambientais cuja população humana está exposta. E, sendo a pele o órgão mais exposto, a ocorrência de diversos tipos de tumores de pele está associada a exposição a esse fator ambiental. Atualmente, é amplamente aceito pela comunidade científica o conceito no qual sugere que os raios UV presentes na luz solar sejam os maiores fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pele. O que reforça ainda mais essa ideia é o fato de que a cadeia de eventos fotocarcinogênicos envolve a formação de lesões de DNA, após a exposição à luz UV, seguida pela formação de mutações nos sítios do DNA que contém os danos e, finalmente, a transformação celular, podendo essa ser maligna, após a acumulação de uma quantidade suficiente de mutações em genes críticos [45].

Sendo assim, diversas pesquisas dentro da dermatologia investigativa comprovam esse raciocínio. Dentre essas, existem exemplos recentes nos quais demonstram que carcinomas de células escamosas e de células basais se desenvolvem quase que exclusivamente em áreas expostas à luz solar, sendo os indivíduos que raramente se bronzeiam ou os que se queimam facilmente, aqueles que apresentam o maior risco para esses tipos de tumores [46, 47]. Portanto, faz-se aqui necessária a apresentação de um exemplo ilustrativo que contextualiza essa problemática, que é apresentado na Figura 5.

Figura 5: Os problemas da exposição solar excessiva para a saúde humana. Quando a pele humana encontra-se exposta à luz solar sem a devida proteção, os raios UV induzem lesões no DNA das células desse órgão. Essas lesões são reconhecidas e reparadas pelos mecanismos de reparo de DNA. O funcionamento correto desses sistemas de raparação, frente ao número de lesões formadas, permite que as células proliferem normalmente. Mas, se a exposição ao sol for muito prolongada e a quantidade de lesões for muito elevada, essas células sofrerão consequências drásticas que culminarão em processos de morte celular, seja por necrose ou apoptose. Diferentes fenótipos causados pela morte celular induzida por UV podem ser verificados, tanto em curto prazo (eritema e até queimaduras de pele) como em longo prazo (fotoenvelhecimento e catarata). Além da morte celular, como consequência do número excessivo de lesões de DNA, a maquinaria de reparo de DNA pode falhar ou funcionar de forma ineficiente (caso visto em algumas síndromes genéticas humanas), o que também pode levar a processos de morte celular, porém, neste caso, devido à formação de mutações. A formação de mutações também pode levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer de pele, incluindo o melanoma maligno.

A radiação UV solar possui um espectro de diferentes comprimentos de onda com diferentes propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotobiológicas. Como já destacado anteriormente, os raios UV que incidem na superfície terrestre são divididos em UVB (280-315 nm) e UVA (315-400 nm; na qual é subdividida em UVA2, 315-340 nm, e UVA1, 340-400 nm) [45]. Contudo, esta divisão é arbitrária, feita de acordo com a interação biológica de cada banda de UV, o que é facilmente reproduzido e estudado em laboratórios, através do uso de lâmpadas e filtros específicos.

No “mundo real” esses comprimentos de onda incidem concomitantemente e são capazes de induzir diferentes impactos na saúde humana. Além disso, o próprio espectro de incidência de radiação UV solar sofre variações, que são dependentes de fatores climáticos, como condições atmosféricas, e geográficos, como latitude e altitude. Portanto, a contribuição relativa dos diferentes comprimentos de onda (de uma maneira simplificada, UVB versus UVA) na base do desenvolvimento de processos fotodermatológicos como fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese, ainda é matéria de árduos debates dentro da comunidade científica. Desta forma, a problemática que envolve os efeitos da exposição excessiva à luz solar, principalmente em relação a qual tipo de lesão de DNA é induzido por UVB e/ou UVA, vem sendo estudada de forma extensiva em todos os continentes.

Nós sabemos que os comprimentos de onda de UVB são os mais energéticos, mutagênicos e carcinogênicos componentes da luz solar. Esses são diretamente absorvidos pelo DNA e levam a produção de fotoprodutos diméricos entre pirimidinas adjacentes. Mas, o outro componente da radiação UV solar (a radiação UVA) também é mutagênico em culturas de células [48, 49] e induz a formação de tumores em camundongos [50]. Somando-se a isso, tem sido demonstrada a participação de UVA em processos de imunossupressão [51], além de existir a suspeita de existir um papel importante na indução de melanoma, a forma mais agressiva de câncer de pele [52, 53].

Outros fatores que se somam a essa mesma problemática são o incorreto uso de fotoprotetores pela população e a alta fotorreatividade de algumas moléculas utilizadas como filtros solares, que estão disponíveis no mercado. Até recentemente, a grande maioria dos produtos oferecia proteção efetiva apenas contra os raios UVB, deixando subentendida a permissão de uma maior exposição ao sol. Adicionalmente, é importante ressaltar que praticamente todos os filtros solares comercializados atualmente apresentam algum nível de fotorreatividade e, em alguns casos, a combinação de diferentes filtros de radiação UVB e UVA pode levar a uma rápida perda da proteção contra a radiação UV total [54]. Além dessa questão, ainda temos hoje o uso abusivo de câmaras de bronzamento artificiais com finalidades estéticas, o que acaba levando a um grande aumento da quantidade de radiação UVA recebida por grande parte da população [55, 56].

Complementado essa reflexão, é de extrema importância considerar a ação antropogênica sobre o meio ambiente, principalmente sobre a atmosfera, o que também poderá acarretar consequências graves dentro da problemática da exposição humana à luz solar. Atualmente, esse tema vem recebendo um impacto crescente dentro da comunidade científica, principalmente em relação às consequências da interação da redução da camada de ozônio com as mudanças climáticas (aquecimento global) sobre a saúde pública. Desta forma, estima-se que o risco de desenvolvimento de câncer de pele no Reino Unido terá um acréscimo de 5.000 novos casos por ano até a metade desse século. Isto ocorrerá pelo fato do aquecimento global aumentar a frequência de eventos de temperatura extrema, principalmente no verão. Assim, as pessoas se sentirão mais encorajadas a passar mais tempo em locais abertos e, muito provavelmente, desprovidas da proteção adequada devido às elevadas temperaturas [57]. Dentro dessa análise, podemos também estimar uma consequência semelhante, porém significativamente maior em regiões de clima tropical como o Brasil. A exposição excessiva da população às altas doses de radiação UV solar que incidem no território brasileiro poderá acarretar um impacto enorme em diferentes setores da saúde pública. Onde a população de baixa renda, com pouca informação sobre o assunto e desprovida de recursos financeiros para proteger a pele adequadamente, sofrerá com o aumento da frequência de eventos de tumores de pele, ocasionando assim, em uma elevação da procura por atendimentos em hospitais e postos de saúde e dos gastos com o tratamento dessa doença pelo sistema público de saúde. É importante destacar que o sistema de saúde brasileiro já sofre com a elevada incidência de câncer de pele da população, cuja, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2008 foram 120.930 novos casos da doença.

Em relação à destruição da camada de ozônio, até o momento, o que se pode afirmar é que alterações na intensidade e na distribuição dos comprimentos de onda da radiação UV solar podem provocar mudanças na sua ação biológica sobre a saúde humana e sobre os demais ecossistemas [13]. Isto se dá principalmente pelo fato de que os espectros de absorção da luz UV apresentados tanto pela molécula de ozônio quanto pela de DNA serem muito semelhantes, o que significa que a camada de ozônio, que protege os seres vivos dos nocivos raios UV, na verdade funciona como um perfeito guarda-chuva para proteger a molécula de DNA [1, 58].

Portanto, o monitoramento correto, através de análises interdisciplinares, dos efeitos biológicos da radiação UV solar será de fundamental importância na tentativa de se evitar graves consequências em termos de saúde pública para as próximas décadas.

1.5 O esforço mundial para o monitoramento dos efeitos biológicos da radiação UV solar

A atividade humana tem produzido diversos tipos de substâncias químicas e gases destrutivos que, ao atingirem a alta atmosfera, perturbam o balanço atmosférico através da interação com a molécula de ozônio. Dentre esses, em termos de potencial destrutivo da camada de ozônio, os clorofluorcarbonos (CFCs) merecem um grande destaque.

A descoberta do “buraco” na camada de ozônio foi um grande choque para o mundo todo, pois uma das consequências da redução da concentração do ozônio estratosférico é o aumento da incidência da radiação UV na superfície, especialmente de UVB. Desde o conhecimento de sua existência, cerca de 11 anos de trabalho árduo, pesquisas e negociações se passaram para que a primeira reunião geral sobre esse tema fosse promovida em 1985. Esse encontro ficou conhecido como Convenção de Viena para a Proteção da Camada de Ozônio e foi realizado na tentativa de proteger esse componente vital para a manutenção da vida na Terra. Contudo, o objetivo de reduzir a produção e principalmente a liberação de substâncias destruidoras do ozônio, como os CFCs, foi alcançado apenas através de acordos específicos que foram fechados em 1987, com o Protocolo de Montreal [1]. Para um maior entendimento da ação destruidora desses gases na atmosfera, um esquema representativo contextualizando esse fenômeno é apresentado na Figura 6.

Figura 6: Esquema do fenômeno de destruição do ozônio pela ação dos CFCs. A atividade humana libera substâncias químicas altamente reativas na atmosfera, nas quais, tem a propriedade de interagir com a molécula de ozônio, localizada na estratosfera terrestre. As consequências principais desse processo são a redução da concentração do ozônio estratosférico e o aumento da incidência dos nocivos raios UV na superfície terrestre.

Atualmente, a redução da camada de ozônio estacionou graças às políticas de policiamento adotadas com ênfase ao redor do mundo. Desta forma, a atmosfera atingiu um balanço estabilizando o seu nível de concentração de ozônio estratosférico [1]. Porém, apesar do avanço do nosso entendimento sobre os efeitos da radiação UV nos ecossistemas terrestres, o impacto da combinação da incidência de radiação UV com outros fatores do aquecimento global e da atividade humana (como, aumento da temperatura, de CO₂, precipitação alterada e disponibilidade de nitrogênio no solo) ainda não é conhecido. De acordo com dados da literatura, o que se pode citar a respeito dessa combinação de fatores ambientais é que, aparentemente, os níveis de CO₂ não alteram a resistência de plantas frente à radiação UV. Mas a exposição a temperaturas extremas resultou em um aumento da sensibilidade das mesmas a essa radiação [59]. Nesse mesmo trabalho, também

foram avaliadas as consequências do aumento da concentração de nitrogênio no solo e, neste caso, plantas cultivadas nessas condições tornaram-se mais sensíveis à radiação UV [59].

Portanto, fica clara a noção de que o aumento da exposição à radiação UV solar pode sim já estar causando problemas ecológicos severos, prejudicando o desenvolvimento e manutenção de diferentes espécies de organismos (de fitoplânctons e plantas, por exemplo) que se encontram continuamente expostos aos raios solares durante o dia [60-62]. Adicionalmente, há muitos anos já se sabe que a exposição acumulativa à luz solar exerce uma grande importância no desenvolvimento do câncer de pele em humanos [12].

Desta forma, na tentativa de se avaliar a ação biológica da luz solar, esforços mundiais estão sendo dispendidos para desenvolver sistemas de dosimetria, através do uso de materiais biológicos [10, 63, 64]. Pelo fato do DNA ser o principal alvo da radiação UV nos organismos vivos, a sua utilização como um dosímetro molecular para a detecção de danos torna-se muito apropriada. De fato, já foi desenvolvido um dosímetro de DNA para avaliar a ação da radiação UVB. Esse foi baseado em mini pontos de DNA de bacteriófago λ desidratado e fixados num filme transparente à luz UV. Nesse caso, os danos de DNA induzidos pela luz UVB bloqueiam a reação de polimerase em cadeia (PCR), reduzindo a quantidade do produto amplificado nas amostras expostas à luz UVB em relação ao controle não exposto [65].

A possibilidade de avaliar a absorção da energia solar pelo DNA também foi considerada em experimentos nos quais irradiaram esporos bacterianos sensíveis à UV (esporos de *B. subtilis* UVSSP), células bacterianas (*E. coli* K12-AB2480) e bacteriófagos (fago de *E. coli* T4vx) com lâmpadas de UV e diretamente na luz solar [66]. Em outro trabalho de pesquisa, quatro dosímetros biológicos diferentes (esporos de *B. subtilis* [10, 67], DLR-biofilm, desenvolvido também a partir de esporos de *B. subtilis* [68], bacteriófago T7 [69] e a Camada Fina de Uracil Policristalina [70]) foram avaliados em conjunto como potenciais biodosímetros em experimentos de campo e de laboratório, com o objetivo de determinar a relevância biológica de cada sistema como detectores ambientais de UV [71]. Pesquisas adicionais têm demonstrado que os dosímetros descritos acima podem ser utilizados em diferentes aplicações de campo e até mesmo no monitoramento da radiação solar extraterrestre [72].

Outro método muito comum para se ter acesso ao potencial dano biológico causado pela radiação solar é o cálculo da dose biologicamente ativa da luz solar, que é obtida através da transformação de dados da radiação solar incidente com algum espectro de ação biológica de interesse, através do uso de espectrorradiômetros. Mas, esses são aparelhos grandes, caros e que requerem frequentes calibrações que são economicamente onerosas. Além disso, pelo fato desses aparelhos utilizarem espectros de ação artificiais para correlacionar dados espectrais com efeitos biológicos, a avaliação exata dos danos estimados pelos espectrorradiômetros em relação aos verdadeiros efeitos biológicos produzidos após um determinado período de exposição à luz solar ainda permanece obscura. Desta forma, biodosímetros tornam-se um método muito conveniente para monitorar os efeitos biológicos induzidos pela luz solar e, conseqüentemente, para complementar o monitoramento que vem sendo amplamente exercido por dosímetros físicos em diversas localidades do planeta [10, 63, 64].

A grande importância associada a esse assunto também despertou o interesse de estudo no nosso grupo de pesquisa aqui no Brasil. Sendo assim, nesse trabalho é descrito o desenvolvimento de um sistema versátil e confiável, construído com o objetivo de avaliar os efeitos da radiação UV solar gerados diretamente na molécula de DNA, no qual foi chamado de Dosímetro de DNA (P.I. 0.705.124-7 de 17/10/2007). Nesse biodosímetro, a determinação da indução de diferentes classes de lesões de DNA é feita através da utilização das enzimas de reparo de DNA T4-endonuclease V (T4-endo V, que reconhece especificamente dímeros de pirimidina ciclobutano – CPDs), Formamidopirimidina-DNA glicosilase (Fpg, que reconhece danos oxidativos, principalmente em purinas) e *Ultraviolet Damage Endonuclease* (UVDE, que reconhece tanto lesões CPDs quanto 6-4PPs). Também, são utilizados anticorpos específicos para as lesões CPDs e 6-4PPs, para confirmar a presença desses fotoprodutos após as exposições à luz UV.

Complementando estas análises, são realizados ensaios de frequência de mutação e da taxa de inativação biológica de DNA através do uso de linhagens de *E. coli* MBL50 (proficientes e deficientes em reparo de DNA) e do vetor *pCMUT*, que transporta o gene *supF* como alvo mutagênico. Adicionalmente, após a transformação das amostras de DNA plasmidial expostas à luz solar em bactérias,

Introdução

torna-se possível determinar o espectro mutagênico do gene *supF* do vetor *pCMUT*, através de técnicas relativamente simples.

Portanto, acreditamos ter desenvolvido um sistema completo capaz de prover uma ampla compreensão dos efeitos da radiação UV solar em diferentes níveis biológicos e esperamos poder colaborar de forma significativa na avaliação da ação mutagênica induzida pela luz solar em diferentes latitudes.

2 Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho é desenvolver uma ferramenta aplicada ao estudo dos danos induzidos pela radiação solar na molécula de DNA e também capaz de avaliar a mutagenicidade associada a sua incidência na superfície terrestre. Pretendemos também empregar essa ferramenta para o desenvolvimento de um programa de monitoramento da radiação UVB e UVA solar e de seus consequentes danos biológicos. Portanto, abaixo se encontram listados os objetivos específicos desse projeto:

- Obter uma cepa de *E. coli* MBL50 mais sensível à UV (mutada no gene de reparo de DNA *uvrA*), que servirá como indicadora da inativação de DNA plasmidial e da mutagênese induzida pela luz solar;
- Obter os espectros de lesões e de mutagênese induzidos por exposições às lâmpadas de UVB, UVA e luz solar;
- Estabelecer comparações e correlações entre as análises efetuadas pelos radiômetros de UVB/UVA com as medidas biológicas obtidas através da aplicação do sistema Dosímetro de DNA na cidade de São Paulo (Campus da USP) e em outras latitudes do Brasil e da América do Sul;
- Comparar a eficiência de indução de lesões no DNA após a realização de exposições do Dosímetro de DNA à luz solar em diferentes latitudes.

3 Materiais e Métodos

3.1 Linhagens bacterianas e plasmídeo

Nesse trabalho, foram utilizadas as linhagens de *E. coli* DH10b (*F*, *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *80lacZM15*, *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *ara139*, *galU*, *galK*, *rpsL*, *nupG*, *tonA*, *STM^R*) e MBL50 (*F*, *CA7020*, *lacY1*, *hsdR*, *ghsdM*, *galU*, *galK*, *rpsL*, *thi*, *lacZ* (AM), Δ (*araBAC-leu*)7679 *araD⁻* *araC* (AM), *TET^R*) [73], cujas foram preparadas eletro-competentes e transformadas com o vetor plasmidial *pCMUT* (1762 bp) (*C* – resistência à cloranfenicol; *MUT* – gene *supF*, alvo para estudos de mutagênese), para a utilização em procedimentos de purificação de DNA plasmidial em larga escala e experimentos de inativação de DNA e mutagênese. A cepa *MBL50ΔuvrA* contém basicamente o mesmo genótipo da *MBL50*, porém com uma mutação no gene *uvrA*. Essa linhagem foi construída nesse laboratório.

3.2 Construção do vetor plasmidial *pCMUT*

Pelo fato do plasmídeo *pAC189* apresentar uma baixa capacidade de replicação e uma grande dificuldade de obter DNA na forma superenovelada durante a sua purificação, foi realizada a construção de um novo plasmídeo capaz de superar esses problemas experimentais.

A obtenção do plasmídeo *pCMUT*, a partir do vetor *pAC189*, foi feita por uma simples reação de digestão e de ligação com a enzima de restrição *EcoRI* e com a enzima DNA ligase (New England Biolabs, USA), respectivamente. Com essas reações, foram retirados o gene de resistência à ampicilina, a origem de replicação de vírus SV40, os genes de antígenos de SV40 e a região do fago M13 que permite obtenção de DNA simples fita. Desta forma, obteve-se um vetor com um tamanho aproximado a 1,7 kbp, que mantém as funções essenciais para o seu uso como biomonitor.

Após a purificação do produto da reação com o kit S.N.A.P.™ Gel Purification Kit (Invitrogen, USA), foi realizada uma reação de ligação das duas extremidades do novo plasmídeo com o uso da enzima DNA ligase (New England Biolabs, USA). Posteriormente, esse vetor foi transformado na linhagem de *E. coli* DH10b para ser

feita uma preparação de DNA plasmidial em larga escala. As amostras de DNA plasmidial foram purificadas com o kit comercial Quiagen Maxi Kit (Quiagen, USA) e armazenadas em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA). Experimentos complementares de purificação de amostras de DNA plasmidial pela técnica de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério [74] também foram realizadas neste trabalho.

Na Figura 7, estão representados os mapas genéticos dos plasmídeos *pAC189* e *pCMUT*, assim como, os sítios de restrição de *EcoRI* e uma representação simplificada da obtenção desse último vetor.

Figura 7: Mapa genético do plasmídeo *pCMUT*, originado através da digestão do plasmídeo *pAC189* com a enzima de restrição *EcoRI*. Estão indicadas as principais características dos vetores: *ori* – origem de replicação bacteriana; *amp* – gene de resistência à ampicilina; *supF* – gene alvo para mutagenese; *cat* – gene de resistência à cloranfenicol sob o promotor *trp*; *OriSV* – origem de replicação de SV40; *T,t* e *T* – genes de antígenos de SV40; *IG* – região do fago M13 que permite obtenção de DNA simples fita. Os mapas dos plasmídeos não estão em escala.

3.3 Construção de bactérias eletro-competentes

No dia anterior ao procedimento, a linhagem bacteriana de interesse foi estriada numa placa de Petri contendo meio LB sólido (Luria-Bertani Medium – bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1,5%) adicionado do antibiótico específico. No dia seguinte, uma colônia foi isolada em 2 ml de LB (Luria-Bertani Medium – bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) com

antibiótico e incubadas a 37 °C por 16 horas. Após esse período, essa cultura foi diluída (1:1.000) em 200 ml de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação constante até atingir densidade óptica (D.O.) entre 0,5 e 0,6 a 600 nm. Em seguida, o volume foi distribuído em 4 tubos de 50 ml previamente imersos no gelo. Esses foram mantidos nessa condição por mais 15 minutos. Os 4 tubos, cada um contendo 50 ml da cultura bacteriana, foram centrifugados a 5.000 rpm, por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 10 ml de glicerol 10% (estéril) gelado, em seguida o volume de cada tubo foi completado para 50 ml da mesma solução. Uma nova centrifugação a 5.000 rpm, por 15 minutos a 4 °C foi realizada. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensionado em 10 ml de glicerol 10% (estéril) gelado e o volume de cada tubo foi completado para 25 ml de glicerol 10% (estéril) gelado. O volume total de dois tubos foi colocado em apenas um, de forma a se obter dois tubos com 50 ml cada. A mesma centrifugação foi realizada novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 10 ml de glicerol 10% (estéril), e centrifugado uma última vez a 5.000 rpm, por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1,0 ml de glicerol 10% (estéril). Esse volume foi aliqotado em microtubos (50 µl) previamente imersos no gelo e estocados a -80 °C.

3.4 Transformação de bactérias eletro-competentes por eletroporação

O sistema utilizado para a transformação de bactérias por eletroporação é o Gene Pulser II (Bio-Rad, USA). Nesse procedimento, primeiramente, cubetas estéreis de eletroporação foram previamente imersas no gelo. No microtubo que continha 50 µl da bactéria eletro-competente, foi adicionado 1 µl de DNA plasmidial (0,1 – 1,0 ng/µl). Esse conteúdo foi transferido para o fundo da cubeta evitando a formação de bolhas. Em seguida foi procedido o eletrochoque no eletroporador a 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Imediatamente após o eletrochoque, foi adicionado 1 ml de meio SOC (SOB – bacto-triptona 2%, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6,8 – acrescido de 20 mM de glicose). Esse conteúdo foi transferido para tubo de cultura bacteriana de 2 ml e incubado a 37 °C, por 1 hora sob agitação constante. Ao final desse período, o volume desejado foi plaqueado em placa de Petri contendo o meio LB sólido (Luria-Bertani Medium –

bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1,5%) com antibiótico, seguido de incubação a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, o número de colônias bacterianas foi contado e a eficiência de transformação da bactéria eletro-competente foi determinada em unidades formadoras de colônias por micrograma (UFC/μg) de DNA plasmidial.

3.5 Irradiação de amostras de DNA plasmidial a fontes artificiais de radiação UV: etapa preliminar ao desenvolvimento do Dosímetro de DNA

Nos primeiros experimentos de irradiação de amostras de DNA plasmidial com fontes artificiais de radiação UV, gotas de solução de DNA contendo o vetor *pCMUT* (100 ng/μl) diluído em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) foram colocadas em placas de Petri de 30 mm de diâmetro e irradiadas com lâmpadas de UVC, UVB e UVA. Os tratamentos com essas fontes artificiais foram feitos com condições controladas dentro do laboratório, pelo uso das lâmpadas: Philips UVC lamp TUV 15 W/G15 T8, UVB Vilber Loumart T 15M 15 W filtrada com uma placa de policarbonato para eliminar a contaminação com luz UVC e UVA Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W filtrada com o filtro Schott BG39 3 mm de espessura (Schott Glass, Germany). As taxas de dose dessas lâmpadas foram medidas pelo Radiômetro de UV VLX 3W (Vilber Loumart, France), onde os valores obtidos foram de 3,26 J/m²/s, 4,8 J/m²/s e 87 J/m²/s, respectivamente. Os espectros de irradiância das lâmpadas de UVB e UVA são apresentados na Figura 8. A quantidade de contaminação de radiação UVC para a lâmpada de UVB, assim como, de UVC e UVB para a lâmpada de UVA estava abaixo dos limites de detecção do aparelho.

Figura 8: Espectro de irradiância das lâmpadas de UVB e UVA. A. Espectro de emissão da lâmpada de UVB Vilber Loumart T 15M 15 W com ou sem filtro de policarbonato. B. Espectro de emissão da lâmpada de UVA Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W na presença ou ausência do filtro Schott BG39 3 mm de espessura (Schott Glass, Germany). Os espectros foram obtidos com o uso de um Espectrorradiômetro HR4000 Ocean Optics 1560. A temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram determinadas pelo Termohigrometro Visomes LV12168/06 e os valores variaram entre 21 – 22 °C e 60% - 70%, respectivamente.

3.6 Exposições do Dosímetro de DNA a fontes artificias de radiação UV e à luz solar natural

Com a construção do sistema Dosímetro de DNA, uma nova padronização dos experimentos de exposição de amostras de DNA plasmidial a fontes artificiais de luz UV foi realizada. Nesse caso, foram utilizadas apenas as lâmpadas de UVB e

UVA, com o objetivo de estudar separadamente os efeitos dos comprimentos de onda da luz solar, para que, posteriormente, pudéssemos partir de fato para as análises ambientais.

Essas irradiações foram feitas dentro do laboratório, com o uso das mesmas lâmpadas e sob as mesmas condições de temperatura e umidade. Desta forma, gotas (20 µl) de solução de DNA contendo o vetor *pCMUT* diluído em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) (100 ng/µl) foram armazenadas dentro do sistema Dosímetro de DNA para a irradiação com as lâmpadas de UVB e UVA descritas. Esse procedimento de exposição de amostras de DNA plasmidial também foi realizado para as exposições ambientais desse sistema. A Figura 9 mostra um exemplo de uma exposição desse sistema aos raios solares e as diferentes lesões de DNA estudadas nesse trabalho.

Figura 9: Exposição do Dosímetro de DNA à luz solar e os diferentes tipos de lesões estudadas com a aplicação dessa tecnologia.

As exposições ambientais do Dosímetro de DNA foram realizadas em diferentes latitudes do Brasil e da América do Sul. As localidades estudadas ao longo desse trabalho foram: Punta Arenas, extremo sul do Chile (Latitude - 53° 1' S; Longitude - 70° 9' O), São Martinho da Serra/RS (Latitude - 29° 44' S; Longitude - 53° 82' O), São Paulo/SP (Latitude - 23° 32' S; Longitude - 46° 38' O) e Natal/RN (latitude - 5° 47' S; Longitude - 35° 12' O). As exposições foram contínuas, em dias de céu claro, das 10:00 às 14:00 horas. Paralelamente às exposições desse biodosímetro, a incidência de radiação UVB/UVA solar foi monitorada por radiômetros específicos para essas bandas de UV (UV-B Radiometer e UV-A Radiometer, EKO Instruments Trading Co. Ltd., Japão), que se encontram instalados em centros de pesquisas que também exercem cooperação científica com o grupo japonês. A Figura 10 mostra uma foto da plataforma de monitoramento da radiação UV solar instalada no teto do laboratório de Reparo de DNA da USP, São Paulo/SP (ICB-II/USP-SP).

Figura 10: Plataforma de monitoramento da radiação UVB e UVA solar instalada no ICB-II, Campus da USP, cidade de São Paulo – SP.

3.7 Quantificação de lesões no DNA exposto à luz UV através da utilização de enzimas de reparo de DNA (T4-endo V, Fpg e UVDE)

Para determinar os danos causados pelos diferentes comprimentos de onda de luz UV empregados, amostras de 200 ng de DNA plasmidial foram tratadas com 70 ng da enzima T4-endonuclease V, que é produzida nesse laboratório (T4-endo V – proveniente do bacteriófago T4 e reconhece especificamente dímeros de pirimidina

ciclobutano – CPDs), 0,8 U da enzima Formamidopirimidina-DNA glicosilase (Fpg – proveniente de *E. coli* e reconhece danos oxidativos, principalmente em purinas) (New England Biolabs, USA) e 250 ng da enzima *Ultraviolet Damage Endonuclease* (UVDE – proveniente da levedura *S. pombe* e reconhece tanto lesões CPDs quanto 6-4PPs) (Trevigen, USA). Essas reações enzimáticas foram realizadas por 30 minutos a 37 °C, para as enzimas T4-endo V e Fpg, e 30 °C, para a UVDE. Essas enzimas possuem a capacidade de reconhecer lesões de DNA específicas e de clivar a ligação fosfodiéster no sítio da lesão, resultando no relaxamento de moléculas de DNA plasmidial superenoveladas.

A determinação e quantificação dos diferentes tipos de danos de DNA formados foram realizadas após eletroforese em gel de agarose 0,8% e análises de densitometria das bandas de DNA do gel (Image Quant 300, GE Healthcare, USA).

O número de sítios sensíveis às enzimas por kbp corresponde a uma distribuição de Poisson [75]. Baseado nessa premissa, pode se calcular o número de lesões através da seguinte fórmula:

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

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

3.8 Preparação da enzima T4-endonuclease V

Inicialmente, foi necessário fazer meio mínimo para a linhagem de *E. coli* T4 *endo V*, que foi gentilmente cedida pelo Professor Philip Hanawalt da Universidade de Stanford (USA), através da preparação das seguintes soluções: a) 20% sulfato de magnésio, b) 4 mg/ml de uracil, c) 4 mg/ml de histidina, d) 4 mg/ml de leucina, e) 20% de glicose, f) 50 mg/ml de ampicilina, g) 1% de tiamina hidrocloreto, h) 15 g de ágar em 800 ml de água destilada, i) 10,5 g de fosfato de potássio dibásico, 4,5 g de

fosfato de potássio monobásico, 1,0 g de sulfato de amônia e 0,5 g de citrato de sódio em 160 ml de água destilada. Após serem autoclavadas, as soluções “h” e “i” foram esfriadas para 50 °C e misturadas. Em seguida, foi adicionado 1 ml da solução “a”, 10 ml da solução “b”, 10 ml da solução “c”, 10 ml da solução “d”, 10 ml da solução “e”, 0,5 ml da solução “g” e 1 ml da solução “f”. Essa solução final foi bem misturada e espalhada em placas de Petri imediatamente.

Nas placas de meio mínimo suplementado com 50 µg/ml de ampicilina, foi estriada a bactéria e essa foi incubada a 37 °C. O crescimento demora entre 18 e 24 horas. Em seguida, uma colônia foi inoculada em 2 ml de L-broth suplementado com 50 µg/ml de ampicilina e incubada a 37 °C por 16 horas (L-broth = 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 litro de água destilada. Autoclavar). No dia seguinte, foi feita uma diluição 1:100 dessa cultura bacteriana em 100 ml de L-broth (50 µg/ml de ampicilina) e essa foi incubada a 37 °C até atingir a D.O. 0,4 (λ 650 nm). Após foi adicionado 100 µl de IPTG (200 mg/ml) e a cultura foi incubada a 37 °C por mais 2h e 30min. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 10 ml de NET (100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA pH 8,0 e 10 mM de Tris pH 8,0). As células bacterianas foram lisadas por sonicação, usando 6 ciclos de 15 segundos com intervalos de 30 segundos com amplitude 35 ohms, cuidando sempre para não superaquecer as amostras (Branson Digital Sonifier, VWR Scientific, USA). Uma centrifugação a 40.000 rpm durante 45 minutos a 10 °C foi realizada e o sobrenadante foi coletado. Esse sobrenadante foi dialisado em NET adicionado de 10% de etileno glicol (v/v) a 4 °C, por 16 horas com agitação constante. Em seguida, a amostra (aproximadamente 10 ml) foi armazenada a 4 °C.

3.9 Identificação de sítios abásicos (sítios AP) e 6-4PPs por tratamento alcalino

A quantificação direta de sítios AP e 6-4PPs foi feita através de uma adaptação da técnica descrita por Higurashi *et al.*, 2003 [76]. Amostras de DNA plasmidial (10 µl) expostas à luz UVA foram diluídas em 20 µl de Na₂HPO₄ 50 mM pH 12,0 e incubadas a 60 °C por 30 minutos para a detecção de sítios AP, devido a sua rápida degradação em condições alcalinas, e 4 horas para 6-4PPs. Em seguida,

as amostras foram colocadas no gelo e neutralizadas com 10 µl de HCl 0,1 M. As quantidades relativas de DNA superenovelado (FI) e circular relaxado (FII) foram quantificadas, como descrito acima, após separação por eletroforese em gel de agarose 0,8% seguida por análises de densitometria (Image Quant 300, GE Healthcare, USA).

3.10 Detecção de lesões CPDs e 6-4PPs por ensaios de Imuno “slot-blot”

Para a confirmação da formação de lesões CPDs e 6-4PPs após exposições do Dosímetro de DNA à radiação UV, amostras do vetor *pCMUT* obtidas após cada tratamento foram misturadas com DNA de espermatozoides de salmão (totalizando 1 µg de DNA), desnaturadas a 95 °C por 10 minutos e imediatamente colocadas no gelo. Esse DNA foi transferido para membranas de nitrocelulose e estas foram incubadas com 150 ml de SSC 5X (750 mM NaCl, 75 mM citrato de sódio) por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, as membranas foram secas à temperatura ambiente e então incubadas a 80 °C por 2 horas. Essas foram bloqueadas em 5% leite em pó desnatado diluído em PBS (*PBS – do inglês, Phosphate Buffer Saline*; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,6) por 16-18 horas a 4 °C e incubadas com os anticorpos primários (anti-CPD e anti-6-4PP, Medical and Biological Laboratories Ltda, Japão) numa diluição de 1:2.000 por 3 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante. Ao final desse período, o anticorpo primário foi removido e foram procedidas 6 lavagens (5 minutos cada) em PBST (0,1% Tween 20 em PBS). O anticorpo secundário (anti-camundongo conjugado com a enzima Horseradish Peroxidase - HRP, GE Healthcare, USA) foi adicionado na mesma proporção mencionada anteriormente e as membranas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante. Novamente, a remoção do anticorpo secundário foi procedida por 6 lavagens em PBST. Após, foi adicionado o reagente de quimioluminescência (Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system, GE Healthcare, USA), o qual gera um sinal luminoso pela oxidação desse reagente pela enzima HRP, que está conjugada ao anticorpo secundário. A membrana foi analisada pelo sistema detector de quimioluminescência (Image Quant 300, GE Healthcare, USA).

3.11 Obtenção de cepas de *E. coli* MBL50 mais sensíveis à radiação UV mutadas para genes de reparo de DNA

A obtenção de uma cepa de *E. coli* MBL50 deficiente no gene de reparo *uvrA* foi baseada na técnica descrita por Datsenko & Wanner, 2000 [77]. A estratégia dessa técnica é a substituição de uma sequência cromossomal por um gene de resistência à antibiótico, gerado por uma reação de PCR, através do sistema Red de disrupção gênica, no qual inclui três genes: γ , β e *exo* cujos produtos são Gam, Bet e Exo, respectivamente. Gam inibe a exonuclease V do sistema RecBCD do hospedeiro, de modo que as recombinases Bet e Exo tenham acesso ao DNA exógeno, promovendo a sua recombinação no genoma.

O sistema de recombinase Red está presente no plasmídeo de baixa cópia chamado *pKD46*. Com a utilização desse plasmídeo foi possível fazer a disrupção do gene *uvrA* pela inserção do produto de PCR que foi produzido usando pares de iniciadores de 50 nt, dos quais 36 nt tem similaridade as regiões flangeadoras do gene *uvrA* e 14 nt tem similaridade as extremidades do gene de resistência ao antibiótico canamicina, expresso no plasmídeo *pKD4*. Os iniciadores utilizados nessa técnica são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Conjunto de iniciadores utilizados para a deleção do gene *uvrA* de *E. coli*.

Iniciadores	Sequências
H1 <i>uvrA</i>	gtaagtcagacaagaaagtagagcggccagcgaaatag
H2 <i>uvrA</i>	gagagttttatcaaggagcagcacatgtggtatcaaaa
P1 <i>pKD4/kan</i>	tgtgtaggctggagctgctt
P2 <i>pKD4/kan</i>	gtatacttataggaggaatc
<i>uvrA</i> fow (H1+P1)	gtaagtcagacaagaaagtagagcggccagcgaaatagtgtgtaggctggagctgctt
<i>uvrA</i> rev (H2+P2)	gagagttttatcaaggagcagcacatgtggtatcaaaagtatacttataggaggaatc

Colônias transformantes resistentes à canamicina foram selecionadas para a confirmação do genótipo de disrupção do gene *uvrA* e do fenótipo de sensibilidade à luz UV. Após a seleção, o gene de resistência pôde ser eliminado com o uso do “plasmídeo helper” *pCP20* que expressa a recombinase FRT, que age diretamente

nos sítios FRT (sequências repetidas que flanqueiam o gene de resistência). Desta forma, foram obtidas bactérias mais sensíveis à luz UV, que são melhores indicadores da ação mutagênica induzida pela luz solar. Um esquema simplificado dessa técnica de interrupção gênica é apresentado na Figura 11.

Figura 11: Esquema simplificado da técnica de interrupção gênica em *E. coli*.

3.11.1 Experimento de curva de sobrevivência após exposição à radiação UVC: comparação entre as sensibilidades das cepas *MBL50* e *MBL50 Δ uvrA*

No dia anterior, uma colônia fresca de cada linhagem de bactéria foi inoculada em 10 ml de meio LB (Luria-Bertani Medium – bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) acrescentado do antibiótico tetraciclina (5,0 mg/ml) e incubada a 37 °C por 16 horas. Na manhã seguinte, foram feitas diluições seriadas dessas culturas em NaCl 0,1%. 100 μ l dessas diluições foram semeadas em placas de Petri

contendo meio LB sólido (Luria-Bertani Medium – bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1,5%) acrescido de tetraciclina, para serem expostas à radiação UVC. As doses de radiação UVC e as respectivas diluições utilizadas em cada ponto foram: 0 J/m² – 100 µl da diluição 10⁻⁶; 50 J/m² – 100 µl das diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶; 100 J/m² – 100 µl das diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶; 200 J/m² – 100 µl das diluições 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶. Imediatamente após as irradiações, as placas de petri foram incubadas a 37 °C por 16 horas. A porcentagem de sobrevivência foi calculada pela contagem do número de colônias, seguida da razão entre o número de colônias tratadas, com as respectivas doses de radiação UVC, e o número de colônias nas placas controle (não irradiadas – 0 J/m²).

3.11.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Duas reações de PCR diferentes foram realizadas para confirmar a disrupção gênica do gene *uvrA* das colônias de *MBL50* selecionadas como resistentes à canamicina. Nesse procedimento, uma colônia fresca foi isolada com uma ponteira plástica e colocada diretamente em 50 µl da solução de reação de PCR (5,0 µl 10X PCR Buffer; 1,0 µl 10 mM dNTPs; 1,5 µl 50 mM MgCl₂; 2,5 µl da mistura de iniciadores – 10 µM cada; 0,25 µl Taq DNA polimerase 5 U/µl (Invitrogen, USA); o volume da reação foi completado para 50 µl com água destilada. A reação de PCR para a confirmação do genótipo de deleção do gene de interesse foi feita com os conjuntos de iniciadores “k2 e kt” (k2 – CGGTGCCCTGAATGAACTGC; kt – CGGCCACAGTCGATGAATCC) e “uvrA-P1 e k1” (uvrA-P1 – GTAAGTCAGACAAGAAAGTAGAGCGGCCAGCGAAATAGTGTGTAGGCTGGAGC TGCTT; k1 – CAGTCATAGCCGAATAGCCT). Os microtubos foram incubados em um termociclador Matercycller Gradient (Eppendorf, Germany) a 94 °C por 3 minutos. Em seguida, para cada tubo, foram realizados 35 ciclos de: 94 °C por 45 segundos; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 1h 30min. Os produtos dessas reações de PCR possuem tamanhos aproximados a 471 nucleotídeos e a confirmação da inserção do cassete de resistência à canamicina no genoma das colônias de *MBL50* selecionadas, foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.12 Ensaios de frequência de mutação através do método de seleção positiva de mutações no gene *supF*

No presente trabalho, utilizamos um método simples para a seleção de mutações no gene *supF* transportado por plasmídeo. Esta técnica foi desenvolvida por Ariza *et al.*, 1993 [78] e faz uso da cepa bacteriana *MBL50*, que possui uma mutação no gene *araD*, que é o gene estrutural para a L – ribulose 5 – fosfato 4 – epimerase. Essa mutação não apenas bloqueia a utilização da L-arabinose como fonte de carbono, como também leva a acumulação de um intermediário tóxico para a bactéria (provavelmente, L-ribulose 5-fosfato). A consequência dessa mutação é a inibição do crescimento bacteriano na presença de L-arabinose, sempre que o operon *araBAD* estiver ativo. A resistência a L-arabinose é obtida através de uma mutação adicional capaz regular essa via metabólica. Essa é uma mutação âmbar presente no gene *araC*, que codifica a proteína responsável pelo controle da expressão do operon *araBAD*. Essa mutação impede que esse operon seja ativado na presença da L-arabinose, bloqueando sua rota metabólica e permitindo a sobrevivência celular. Portanto, a bactéria que possuir um vetor com o gene *supF* selvagem será sensível a L-arabinose, uma vez que o tRNA transcrito pelo gene *supF* suprime a mutação âmbar existente no gene *araC*, ativando o operon *araBAD* e, levando então, a formação do produto tóxico durante o metabolismo desse açúcar, culminando na morte celular. Mas, se o gene *supF* estiver mutado, o metabolismo da L-arabinose não é iniciado e evita-se assim a produção do composto tóxico. Desta forma, somente bactérias portadoras de vetores com o gene *supF* mutado serão capazes de crescer em meio contendo L-arabinose.

A seleção das colônias portadoras do plasmídeo contendo o gene *supF* mutado foi feita pelo plaqueamento da bactéria transformada em meio mínimo M9 (18 g NaH₂PO₄.H₂O, 7,5 g KH₂PO₄, 1,25 g NaCl, 2,5 g NH₄Cl, quantidade suficiente de H₂O destilada para 0,5 L) – ágar (1,5%) suplementado com L-arabinose (2 g/L), tiamina (5 mg/L), glicerol (2 g/L), casaminoácidos (100 g/L) e cloramfenicol (34 mg/ml). Um esquema detalhando essa metodologia é descrito na Figura 12.

Figura 12: Esquema geral do mtodo de seleo positiva de mutaes no gene *supF*. A. Representao ilustrativa e simplificada do operon da arabinose em *E. coli*. A mutao no gene estrutural *araD* e a mutao mbar presente no gene *araC* esto indicadas. O tRNA transcrito pelo gene *supF* tem a propriedade de suprimir mutaes mbar, substituindo o cdon de parada (do ingls, stop codon) por um de tirosina, possibilitando assim a ativao desse operon. B. Exemplo do experimento de seleo de mutantes no gene *supF* (frequncia de mutao) aps a realizao de exposies luz solar. Bactrias MBL50 eletro-competentes so eletro-transformadas com o vetor *pCMUT*. Em seguida, essas so semeadas em meio mnimo contendo L-arabinose. Como descrito acima, somente bactrias portadoras do plasmdeo com o gene *supF* mutado so capazes de crescer na presena desse acar.

3.13 Cálculo da taxa de inativação biológica de DNA

A determinação da taxa de inativação biológica do vetor *pCMUT* após tratamento com luz UV é calculada através do fator de redução (*RF – do inglês, reduction factor*) [79]. Este cálculo é feito pela razão entre o número de colônias transformantes com DNA não irradiado em relação ao número de colônias transformantes com DNA irradiado, como apresentado na fórmula abaixo:

$$RF = \frac{\text{número de colônias transformantes (DNA não tratado)}}{\text{número de colônias transformantes (DNA tratado)}}$$

Desta forma, pode-se quantificar a inativação biológica do DNA irradiado em cada dose aplicada através da contagem do número de colônias transformantes obtido em cada ponto.

3.14 Cultura celular

Células de ovário de hamster chinês (CHO-9) selvagens para reparo de DNA, assim como, fibroblastos humanos das linhagens MRC5 (selvagem para reparo de DNA) e XP12RO (deficientes em reparo de DNA – mutadas no gene XPA) foram cultivadas em garrafas de poliestireno com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (*DMEM – do inglês, Dulbecco Modified Eagle Medium*; Invitrogen, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (*FCS – do inglês, Fetal Calf Serum*; Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

3.15 Sub-cultivo de células

As diferentes linhagens de células foram subcultivadas com lavagem de tampão fosfato salino (PBS – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,6), seguida da adição de tripsina-EDTA pelo tempo necessário para que ocorresse a digestão da matriz protéica responsável pela aderência celular. A reação foi então bloqueada pela adição de meio de cultura normal (DMEM), quando então as células foram ressuspensas e passadas para novas garrafas de cultura.

3.16 Irradiação de culturas de células com luz UVB e UVA e extração de DNA genômico

Vinte e quatro horas antes do experimento, foram semeadas 500.000 células em placas de petri de 60 mm de diâmetro. No dia seguinte, o meio de cultura das células foi removido e as mesmas foram lavadas com PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,6) pré-aquecido e irradiadas com 10 kJ/m² de radiação UVB ou 300 kJ/m² de radiação UVA, com as lâmpadas descritas acima. Imediatamente após o tempo de irradiação, as placas foram colocadas no gelo para seguir com a extração do DNA genômico, que foi utilizado para a realização dos experimentos de detecção de lesões de DNA com o uso de anticorpos específicos.

Nessa técnica de extração de DNA, as células foram incubadas 1 minuto a temperatura ambiente em 1 ml de solução 1 (Triton X-100 0,5%; NaCl 0,1 M; EDTA 0,01 M). A solução 1 foi retirada e foram acrescentados 2 ml da solução 2 (SDS 0,5%; Proteinase K 50 µg/ml; NaCl 0,1 M; EDTA 0,01 M), seguida por incubação a 37 °C por 30 minutos. Após, foi adicionado 0,5 ml da solução 3 (NaCl 5 M), seguida novamente por incubação a 37 °C por 15 minutos. As células foram raspadas das placas e colocadas em tubos de poliestireno de 15 ml. Foi adicionado 1 volume de clorofórmio, seguido por agitação por inversão e incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. As células foram centrifugadas a 6.000 rpm por 20 minutos a 4 °C e a fase aquosa superior foi transferida para um tubo novo. Nesse, foram adicionados 2 volumes de etanol e uma nova centrifugação de 6.000 rpm por 30 minutos a 4 °C foi realizada para precipitar o DNA. Após os tubos estarem secos, o DNA foi ressuscitado com tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) adicionado de RNase (0,1 mg/ml) e mantido a 4 °C até a realização do experimento de imuno *slot blot*.

4 Resultados

4.1 Danos de DNA e efeitos genotóxicos induzidos por fontes artificiais de radiação UV: etapa preliminar ao desenvolvimento do Dosímetro de DNA

É importante ressaltar que essa etapa do trabalho foi importante para padronizarmos doses e tempos de exposições de amostras de DNA às fontes de UV aqui empregadas. Também, a partir desses experimentos, foi possível inventar e testar diferentes idéias de possíveis protótipos que poderiam servir como sistema de exposição de DNA à luz solar. Apesar da técnica de irradiação de amostras de DNA plasmidial com lâmpadas de UV em placas de Petri ser muito comum nesse tipo de experimento em laboratórios, esse procedimento se torna inviável quando partimos para experimentos de campo. A falta de controle sobre fatores ambientais como temperatura, umidade e dose de radiação solar, facilmente controlados no laboratório, resultaria certamente na evaporação completa ou perda de grande parte das amostras de DNA expostas à luz solar nessas condições. Portanto, devido a esses fatores fica evidente a importância do desenvolvimento de um sistema hermético e resistente às intempéries do meio ambiente para esse tipo de trabalho científico, no qual será discutido com mais detalhes em seguida.

Para avaliar o impacto de lesões CPDs e de danos oxidativos em efeitos como inativação de DNA e mutagênese, amostras de DNA plasmidial colocadas em placas de Petri foram expostas às lâmpadas de radiação UVC, UVB e UVA, e esses danos foram definidos como sítios sensíveis à T4-endo V e à Fpg (T4-endo V-SS e Fpg-SS). A discriminação entre as formas de DNA superenoveladas e circular-relaxadas foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a quantificação do número de lesões de DNA foi definida por análises densitométricas. Após os experimentos de quantificação de danos ao DNA, foram realizadas análises de inativação de DNA e de frequência de mutação após a transfecção do vetor *pCMUT* (tratado ou não com radiação UV) na linhagem de *E. coli* MBL50. A quantidade dessas lesões de DNA induzidas por luz UVC, UVB e UVA é apresentada na Figura 13.

Resultados

Figura 13: Indução de lesões de DNA após exposições de amostras de DNA plasmidial à radiação UVC (A), UVB (B) e UVA (C). Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes para cada condição de irradiação. Para cada condição de irradiação é apresentado um exemplo representativo da determinação de quebras simples de DNA (SSB), de sítios sensíveis à T4-endo V (T4-endo V-SS) e de sítios sensíveis à Fpg (Fpg-SS). FI indica a forma superenovelada do DNA e FII a circular relaxada.

Resultados

Como esperado, pode ser observado na Figura 13.A e 13.B que a indução de T4-endo V-SS pela luz UVC e UVB é eficiente, dose dependente e de fácil detecção pela enzima. Por outro lado, para ambos os tipos de radiação, a indução de SSB e Fpg-SS foi muito baixa. Amostras de DNA plasmidial também foram expostas a doses crescentes de radiação UVA para avaliarmos o seu perfil de lesões de DNA em comparação aos resultados relatados acima. Como pode ser claramente visto na Figura 13.C, a geração de Fpg-SS foi maior que a de T4-endo V-SS, e as SSB também foram detectadas. Ao compararmos esse resultado com os das Figuras 13.A e 13.B, percebe-se uma alteração no perfil de indução de lesões de DNA após o tratamento dessas amostras com radiação UVA.

Em seguida, depois da irradiação com doses crescentes de radiação UVC, UVB e UVA, as amostras de DNA plasmidial foram transfectadas na linhagem de *E. coli* MBL50 para a realização de análises de inativação de DNA e de frequência de mutação, com o objetivo de avaliarmos a capacidade desses comprimentos de onda induzirem morte celular (representada pela inativação plasmidial) e mutações. Esses resultados são apresentados na Figura 14.

Figura 14: Taxa de inativação de DNA e frequência de mutação após exposições à radiação UVC (A) e (D), UVB (B) e (E), e UVA (C) e (F), respectivamente, e replicação do vetor *pCMUT* na linhagem de *E. coli* MBL50. RF – fator de redução. Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes.

A Figura 14 mostra claramente que, após as irradiações com luz UVC e UVB, tanto a inativação de DNA como a mutagênese, são efeitos dose dependentes. Por outro lado, essas respostas dependentes de dose, que são claramente observadas após as exposições aos menores comprimentos de onda da radiação UV (UVC e UVB), não são tão evidentes após a irradiação com luz UVA.

4.2 Desenvolvimento de um sistema de exposição de DNA à luz solar – a evolução do Dosímetro de DNA

Inicialmente, na construção deste dosímetro biológico, utilizamos como materiais para armazenamento das amostras de DNA plasmidial o acrílico polimetilmetacrilato (PMMA) (www.resarbras.com.br) e o kit Elastômero Sylgard 184 (www.daltomare.com.br). Estes materiais apresentam como principais características uma alta transmitância aos comprimentos de onda referentes à luz UV, uma excelente resistência às intempéries do meio ambiente e um baixo custo em relação a outros materiais como cubetas de quartzo, por exemplo.

A Figura 15 mostra que ambos os materiais apresentam uma boa transmitância para os comprimentos de onda das bandas de UVB (280 –320 nm) e de UVA (320 – 400 nm). Entretanto, a transmitância do elastômero Sylgard 184 é nitidamente superior para comprimentos de onda menores.

Figura 15: Espectros de transmitância do acrílico PMMA e do elastômero Sylgard 184.

Resultados

Com o objetivo de aperfeiçoar a capacidade de transmitância desse sistema de exposição de DNA à luz solar frente aos raios UVB incidentes na superfície, foi desenvolvida uma alternativa para a construção do Dosímetro de DNA. Nesse novo sistema de exposição de DNA foi utilizado apenas o kit Elastômero Sylgard 184, excluindo a utilização do acrílico polimetilmetacrilato (PMMA), melhorando assim as propriedades ópticas do sistema e simplificando o processo de sua construção. A Figura 16 mostra a evolução na construção deste sistema de exposição de DNA à luz solar.

Figura 16: Modelos utilizados como sistema de exposição de DNA. A. Primeiro sistema de exposição de DNA (acrílico polimetilmetacrilato – PMMA). B. Segundo sistema de exposição de DNA (kit Elastômero Sylgard 184).

Atualmente, este segundo sistema também foi modificado com o objetivo de aperfeiçoar o transporte das amostras até o local das exposições ambientais e de melhorar sua apresentação para a comunidade científica. A Figura 17 mostra um novo formato para o sistema aqui desenvolvido (P.I. 0.705.124-7 de 17/10/2007).

Figura 17: Nova forma de apresentação do sistema de exposição de DNA (kit Elastômero Sylgard 184).

4.3 Quantificação das lesões de DNA induzidas por lâmpadas de UVB e UVA: utilização do sistema Dosímetro de DNA

Inicialmente, a qualidade de aplicação do sistema Dosímetro de DNA, como um possível sistema de exposição de amostras de DNA à luz solar, foi avaliada através da quantificação de diferentes tipos de lesões de DNA formadas após exposições desse sistema a fontes artificiais de radiação UVB e UVA, seguidas de tratamentos com as enzimas Fpg (sítios sensíveis à Fpg – Fpg-SS), T4-endo V (sítios sensíveis à T4-endo V – T4-endo V-SS) e UVDE (sítios sensíveis à UVDE – UVDE-SS). A quantificação dos danos induzidos por esses comprimentos de onda foi realizada igualmente aos experimentos descritos anteriormente, os quais não fizeram uso desse sistema. A Figura 18 ilustra um experimento representativo e a Figura 19 apresenta a quantificação desses resultados.

Figura 18: Exemplo representativo da determinação de fotolesões após exposições de amostras de DNA plasmidial no sistema dosímetro de DNA à luz UVB (A) e UVA (B). As amostras foram expostas a doses crescentes de radiação UVB e UVA e tratadas com as enzimas Fpg (Fpg-SS), T4-endo V (T4-endo V-SS) e UVDE (UVDE-SS); no significa ausência de enzimas. FI indica a forma superenovelada do DNA e FII a circular relaxada.

Figura 19: Quantificação das fotolesões de DNA após exposições às lâmpadas de UVB (A) e UVA (B). Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes para cada condição de irradiação. SSB – quebras simples de DNA; Fpg-SS – sítios sensíveis à Fpg; T4-endo V-SS – sítios sensíveis à T4-endo V; UVDE-SS – sítios sensíveis à UVDE.

Como pode ser observado claramente nas Figuras 18 e 19, houve um aumento dose-dependente de DNA na forma FII, quando essas amostras foram expostas à radiação UVB ou UVA e incubadas com as respectivas enzimas de reparo de DNA. A indução de quebras simples (SSB) foi praticamente indetectável para ambos os tipos de radiação. A quantidade de danos oxidativos (Fpg-SS) foi significativamente maior (comparada aos outros fotoprodutos) após a irradiação com UVA em relação à irradiação com UVB. Porém, ao compararmos esse resultado com o da Figura 13.C, observa-se que a taxa de oxidação de bases de DNA em amostras irradiadas dentro de placas de Petri foi surpreendentemente maior em comparação

as exposições realizadas com esse sistema de silicone. Também, na condição anterior, a indução de T4-endo V-SS foi muito menor do que quando essas amostras de DNA foram expostas no Dosímetro de DNA, no qual é altamente transparente a luz UV.

Como esperado, após a exposição à luz UVB, houve uma alta indução de T4-endo V-SS, porém o maior número de UVDE-SS deve-se a formação de outras lesões (inclusive 6-4PPs) além dos CPDs gerados. Também foi possível detectar T4-endo V-SS após exposições com luz UVA e, surpreendentemente, a indução de UVDE-SS foi maior do que a de T4-endo V-SS, indicando desta forma que outro tipo de lesão, que também causa distorção na dupla fita de DNA, foi formada em adição aos CPDs, possivelmente 6-4PPs.

4.4 Avaliação do efeito de possíveis contaminantes do processo de extração de DNA na indução de danos pela radiação UVA: aplicação do sistema Dosímetro de DNA

Para verificar se o próprio processo de purificação das amostras de DNA plasmidial exercia influências no perfil de indução de danos pela luz UVA, devido a eventual presença de cromóforos contaminantes, foram realizadas exposições de amostras de DNA extraídas com o kit comercial Quiagen maxi kit (Valencia, USA) e com a técnica de ultracentrifugação com gradiente de CsCl a doses crescentes de radiação UVA. A Figura 20 mostra uma comparação entre os espectros de absorção dessas amostras de DNA plasmidial e a quantificação das lesões de DNA induzidas após exposições à lâmpada de UVA.

Figura 20: Comparação dos perfis de lesões de DNA induzidos por luz UVA entre amostras de DNA plasmidial purificadas através da metodologia de extração por gradiente de cloreto de céso ou pelo Quiagen maxi kit. A. Espectro de absorção das amostras de DNA plasmidial usando o Quiagen maxi kit (linha vermelha) e gradiente de CsCl (linha preta). B. Indução de fotoprodutos após a exposição à luz UVA das amostras de DNA plasmidial purificadas com gradiente de CsCl. C. Indução de fotoprodutos após a exposição à luz UVA das amostras de DNA plasmidial purificadas com Quiagen maxi kit. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes para cada condição.

A Figura 20.A mostra que, apesar das amostras de DNA plasmidial purificadas por gradiente de CsCl apresentarem maior absorção dos comprimentos de onda da radiação UVC, não existe diferença entre os espectros dessas amostras de DNA em relação aos comprimentos de onda de UVB e UVA. Os perfis de lesões de DNA induzidos pela luz UVA, que são apresentados nas Figuras 20.B e 20.C, mostram uma grande similaridade para os quatro tipos de lesões analisadas. Portanto, esses resultados mostram que a forma de purificação de DNA plasmidial não interfere nas lesões formadas e excluem a possibilidade de que algum

Resultados

cromóforo contaminante das preparações poderia estar causando a indução de danos oxidativos ou fotoprodutos após exposições à lâmpada de UVA.

4.5 Análise da contribuição de sítios abásicos (sítios AP) na indução dos sítios sensíveis à UVDE após exposição à radiação UVA: aplicação do sistema Dosímetro de DNA

Para verificar a possibilidade de sítios AP estarem contribuindo na detecção de sítios sensíveis à UVDE após a exposição à lâmpada de UVA, as amostras de DNA expostas a esses comprimentos de onda foram incubadas com a enzima de *E. coli* endonuclease IV (produto de gene *nfo*) que reconhece e cliva a região do DNA onde está presente um sítio abásico. A Figura 21 mostra a indução de sítios AP (Nfo-SS) em relação às demais lesões estudadas.

Figura 21: Análise da contribuição dos sítios AP em relação aos demais fotoprodutos. A. Exemplo representativo da determinação de fotoprodutos após a exposição do Dosímetro de DNA à luz UVA. As amostras de DNA foram irradiadas com doses crescentes de radiação UVA e tratadas com as enzimas Nfo, Fpg, T4-endo V e UVDE; no representa o mesmo tratamento, mas sem enzima. B. Indução de fotoprodutos de DNA após a exposição à luz UVA. Nfo-SS - sítios sensíveis à Nfo, as demais siglas foram descritas na Figura 13. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

Resultados

A figura 21 mostra claramente que não há indução de sítios sensíveis à Nfo (sítios AP), pois o número de quebras no DNA tratado com a enzima é semelhante aos níveis verificados para as quebras simples de DNA. Esse resultado sugere que os sítios AP não estão contribuindo no aumento da quantidade de sítios sensíveis à UVDE em relação aos sítios sensíveis à T4-endo V após exposição à luz UVA. É importante destacar que, além do seu reconhecimento pela enzima UVDE, os sítios AP também poderiam ser identificados pelas enzimas Fpg e T4-endo V, que também agem como AP liases.

4.6 Detecção de fotoprodutos de DNA com anticorpos específicos (anti-CPD e anti-6-4PP): aplicação do sistema Dosímetro de DNA

Experimentos de imuno “*slot-blot*” foram realizados com o propósito de confirmar e comparar a eficiência de indução de lesões CPDs e 6-4PPs após exposições de amostras de DNA plasmidial às lâmpadas de UVB e UVA. A indução desses fotoprodutos por estas fontes artificiais de radiação UV é apresentada na Figura 22.

Figura 22: Detecção imunológica de lesões CPD e 6-4PP em amostras de DNA plasmidial expostas à luz UVB e UVA. A. Detecção de fotoprodutos através de anticorpos anti-CPD e anti-6-4PP. B. Quantificação da indução de CPD (vezes em relação ao controle – Ø UV). C. Quantificação da indução de 6-4PP (vezes em relação ao controle – Ø UV).

Como esperado, a Figura 22 mostra claramente que a indução de CPDs foi muito eficiente após as exposições às lâmpadas de UVB e UVA. Confirmando os dados obtidos com a enzima UVDE, lesões 6-4PPs também foram detectadas pelo anticorpo anti-6-4PP quando amostras de DNA foram expostas tanto a radiação UVB quanto a UVA. Entretanto, ao contrário do que foi observado para a relação entre UVDE-SS e T4-endo V-SS, a detecção de 6-4PPs pelo anticorpo foi muito menor após a radiação UVA, quando comparada com a sua detecção após a exposição à radiação UVB.

4.7 Identificação da indução de sítios abásicos (sítios AP) e 6-4PPs pela radiação UVA após tratamento alcalino: aplicação do sistema Dosímetro de DNA

Com o objetivo de confirmar a indução de lesões 6-4PPs pela luz UVA, na qual já foi verificada com o uso da enzima UVDE e com o anticorpo específico para essa lesão de DNA, uma terceira metodologia foi desenvolvida para esse fim. Esse método foi adaptado do trabalho de Higurashi *et al.*, 2003 [76] que sugere a degradação de lesões 6-4PPs e sítios AP após tratamento alcalino e monitoramento por HPLC e espectrometria de massa. No presente trabalho, foi adaptado um tratamento alcalino das amostras de DNA expostas à luz UVA, de modo que fosse possível visualizar essas lesões pela técnica de eletroforese em gel de agarose aqui padronizada. A Figura 23 mostra a detecção de sítios AP e 6-4PPs após a exposição das amostras de DNA plasmidial à luz UVA seguida de tratamento alcalino e de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Figura 23: Detecção de sítios AP e 6-4PPs por tratamento alcalino das amostras de DNA plasmidial expostas à luz UVA. **A.** Exemplo representativo da determinação das lesões com tratamento alcalino. **B.** Quantificação dos sítios AP e 6-4PPs induzidos pela luz UVA após o tratamento alcalino das amostras de DNA irradiadas.

Como apresentado na Figura 23, a indução de sítios AP é indetectável através dessa metodologia, confirmando os dados obtidos com a endonuclease Nfo. Por outro lado, é verificado que existe um aumento linear na presença de 6-4PPs em função das doses de radiação UVA empregadas. Desta forma, esse resultado confirma que a maior quantidade de UVDE-SS em relação aos T4-endo V-SS verificada após a irradiação com luz UVA, pode ser devido à presença de lesões 6-4PPs nas amostras de DNA plasmidial expostas a esses comprimentos de onda.

4.8 Detecção de lesões CPDs e 6-4PPs com o uso de anticorpos específicos após exposições de culturas de células às lâmpadas de UVB e UVA

Com o objetivo de investigar a relevância biológica dos resultados já mostrados em relação à detecção de lesões CPDs e 6-4PPs após a irradiação do

Resultados

Dosímetro de DNA em lâmpadas de UVB e principalmente UVA, os mesmos experimentos foram realizados com culturas de células de mamíferos da linhagem CHO9 (proficiente em reparo de DNA) e fibroblastos humanos proficientes (linhagem MRC5) e deficientes em reparo de DNA (linhagem XP12RO).

A Figura 24 mostra o tratamento de células CHO9 com doses de radiação UVB e UVA e a detecção de lesões CPDs e 6-4PPs com o uso de anticorpos específicos.

Figura 24: Detecção imunológica de lesões de DNA após exposição de culturas de células CHO9 às radiações UVB e UVA. A. Detecção de lesões pelos anticorpos anti-CPD e anti-6-4PP. B. Quantificação da marcação do anticorpo anti-CPD (vezes em relação ao controle – 0kJ/m² 200 ng). C. Quantificação da marcação do anticorpo anti-6-4PP (vezes em relação ao controle – 0kJ/m² 200 ng).

Na Figura 24.A, fica evidente que a radiação UVB é muito eficiente em induzir ambos os tipos de lesões de DNA nessas células, visto que a marcação dos anticorpos é muito destacada na amostras expostas a esses comprimentos de onda.

Resultados

Em relação à radiação UVA, verifica-se que a indução de CPDs também é muito pronunciada. Porém, isso não ocorre em relação à indução de 6-4PPs, onde observa-se uma quantidade de lesões muito baixa, se alguma. A quantificação das marcações dos anticorpos anti-CPD na Figura 24.B e anti-6-4PP na Figura 24.C, mostra que a abundância de CPDs gerados pela luz UVB chega a saturação, onde mesmo diminuindo a concentração da amostra de DNA, a intensidade emitida pela banda não diminui; e que a baixa quantidade de 6-4PPs gerados pela luz UVA encontra-se no limite mínimo de detecção, ou seja, muito próximo ao resíduo verificado nas amostras não tratadas.

Para verificar a ocorrência destas lesões em células humanas após a exposição à luz UVB e UVA, utilizamos também as linhagens de fibroblastos humanos MRC5 (proficiente em reparo de DNA) e XP12RO (mutante no gene de reparo de DNA XPA). A Figura 25 mostra os resultados obtidos com essas células.

Figura 25: Detecção imunológica de lesões de DNA após exposição de células MRC5 e XP12RO às radiações UVB e UVA. **A.** Detecção de lesões pelos anticorpos anti-CPD e anti-6-4PP. **B.** Quantificação da marcação do anticorpo anti-CPD (vezes em relação ao controle – MRC5 e XP12RO 0 J/m²). **C.** Quantificação da marcação do anticorpo anti-6-4PP (vezes em relação ao controle – MRC5 e XP12RO 0 J/m²).

A Figura 25.A mostra que a detecção dessas lesões nas amostras de DNA plasmidial foi maior do que a marcação verificada nas duas linhagens de fibroblastos humanos empregadas. Nas Figuras 25.B e 25.C, a quantificação das lesões destaca a sensibilidade do método de exposição de DNA plasmidial a fontes emissoras radiação UV aqui desenvolvido. De maneira geral, fica evidente na Figura 25 que a indução de CPDs ocorre de maneira eficiente após exposição à luz UVB e UVA. Em relação à indução de 6-4PPs, verifica-se que a dose de UVB também gera esse tipo de lesão eficientemente. Por outro lado, não é verificada a marcação de lesões 6-4PPs na células proficientes em reparo de DNA após a exposição à luz UVA. Entretanto, nas células XP12RO, que são deficientes em reparo de DNA por não produzirem a proteína XPA, há uma clara detecção de 6-4PPs nas amostras expostas à UVA, significativamente maior do que o sinal detectado nas amostras controle não irradiadas.

4.9 Aplicação do sistema Dosímetro de DNA no monitoramento da radiação UV solar biologicamente ativa

4.9.1 Danos ao DNA e efeitos genotóxicos induzidos pela luz solar: primeiras exposições ambientais do Dosímetro de DNA (São Martinho da Serra, RS)

A aplicação do sistema Dosímetro de DNA no estudo dos efeitos genotóxicos da luz solar teve, de fato, o seu início com a realização de exposições ambientais na cidade de São Martinho da Serra, RS (Latitude - 29° 44' S; Longitude - 53° 82' O). As exposições foram realizadas em dois dias de céu claro (27 e 29 de dezembro de 2006) e um dia nublado (04 de janeiro de 2007), por 4 horas contínuas, das 10:00 às 14:00. Em paralelo, as doses da radiação UVB/UVA solar foram monitoradas durante os períodos de exposição, por radiômetros específicos instalados no Observatório Espacial do Sul (OES-CRS-INPE/MCT). As doses de radiação UVB e UVA solar, assim como as temperaturas medidas para cada dia de exposição são apresentadas na Tabela 2. A indução de lesões de DNA foi quantificada como descrito anteriormente e os dados são apresentados na Figura 26.

Resultados

Tabela 2: Monitoramento da radiação UVB e UVA solar e temperatura durante os períodos de exposições do Dosímetro de DNA no Observatório Espacial do Sul – OES, RS, Brasil.

Exposições ambientais (29° 4' S)	10:00 – 14:00 UVB (kJ/m ²) 280-315 nm	10:00 – 14:00 UVA (kJ/m ²) 315-400 nm	Temperatura (°C)
27/12/2006	5,2	191,1	23
29/12/2006	4,8	176,7	26
04/01/2007	2,3	81,4	24

Figura 26: Indução de lesões de DNA após exposições do Dosímetro de DNA no OES. Os resultados representam média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata para cada dia de exposição. As amostras controle também são expostas, mas são cobertas com papel alumínio.

Embora a frequência de lesões de DNA tenha variado de acordo com as doses recebidas em cada dia (Tabela 2), a proporção relativa dos diferentes tipos de lesões de DNA observadas na Figura 26, ou seja, o perfil de lesões de DNA foi similar entre os três dias de experimentos. Diferente do que foi observado após a irradiação do Dosímetro de DNA com lâmpadas de UVB e UVA, após a exposição a luz solar nessa latitude, os níveis de Fpg-SS foram muito próximos aos de T4-endo V-SS. Outro fator muito interessante observado na Figura 26 foi a maior indução de

Resultados

UVDE-SS em relação a T4-endo V-SS, indicando a possível formação de CPDs, 6-4PPs e DewarPPs nessas amostras de DNA expostas à luz solar.

Experimentos confirmatórios para os resultados de indução de lesões CPDs e 6-4PPs obtidos com o uso das enzimas de reparo de DNA também foram realizados com o uso de anticorpos específicos para essas lesões. A Figura 27 mostra o experimento de confirmação da presença dos fotoprodutos CPDs e 6-4PPs, assim como a quantificação das marcações de cada anticorpo nas amostras de DNA plasmidial expostas à radiação solar em São Martinho da Serra, RS.

Figura 27: Detecção imunológica de lesões de DNA nas amostras expostas à radiação UVA (25 ng), UVB (25 ng) e luz solar (200 ng). A. Detecção de CPDs e 6-4PPs pelos anticorpos anti-CPD e anti-6-4PP. B. Quantificação da detecção de CPDs após exposição à luz solar (vezes em relação às amostras controle para cada dia). C. Quantificação da detecção de 6-4PPs após exposição à luz solar (vezes em relação às amostras controle para cada dia).

Como pode ser observado na Figura 27, foi possível detectar a marcação dos anticorpos específicos para CPDs e 6-4PPs nas amostras de DNA plasmidial expostas à luz solar no sul do Brasil. Adicionalmente, a quantificação da marcação de cada anticorpo está totalmente de acordo com as doses de radiação UV solar monitoradas para cada dia de exposição (Tabela 2).

Resultados

Com o objetivo de complementar as análises já realizadas e descritas acima, a indução dos efeitos genotóxicos foi avaliada através do cálculo da taxa de inativação de DNA e da frequência de mutação, após replicação do vetor *pCMUT* exposto à luz solar na linhagem de *E. coli* MBL50. Esses dados são apresentados na Figura 28.

Figura 28: Determinação da taxa de inativação de DNA (A) e frequência de mutação (B) após exposições de amostras de DNA plasmidial à luz solar no OES, São Martinho da Serra/RS, e replicação do vetor *pCMUT* na linhagem de *E. coli* MBL50. RF – fator de redução. Os resultados representam média e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata para cada dia de exposição.

A Figura 28 mostra claramente que, consistente com as doses de radiação UV solar (Tabela 2) e as quantidades de lesões de DNA (Figura 26) observados para cada dia de exposição ambiental no OES, a quantificação dos efeitos biológicos, inativação de DNA e mutagênese, correlacionam bem com esses dados mostrados anteriormente.

Complementando essas análises, a contribuição relativa de lesões CPDs e danos oxidativos na indução desses efeitos genotóxicos, foi avaliada separadamente por correlações diretas entre esses danos de DNA e os efeitos biológicos, inativação de DNA e mutagênese, analisando em conjunto todas as condições de exposições realizadas (UVC, UVB, UVA e luz solar). Essas correlações estão apresentadas na Figura 29.

Resultados

Figura 29: Contribuição das lesões de DNA na indução de inativação de DNA e mutagenese na linhagem de *E. coli* MBL50 após exposições de amostras de DNA plasmidial em lâmpadas de UVC, UVB e UVA, e também expostas à luz solar no OES. A. Correlação entre T4-endo V-SS e inativação de DNA. B. Correlação entre T4-endo V-SS e frequência de mutação. C. Correlação entre Fpg-SS e inativação de DNA. D. Correlação entre Fpg-SS e frequência de mutação.

Basicamente, pode ser visto nas Figuras 29.A e 29.B que, independente da condição de irradiação, a indução dos efeitos biológicos, inativação de DNA e mutagenese é diretamente dependente da presença de lesões que causam grandes distorções na dupla fita de DNA, representadas nesse caso por CPDs (T4-endo V-SS), e que a magnitude desses efeitos também está associada a quantidade desses fotoprodutos nas amostras de DNA. Por outro lado, como pode ser visto nas Figuras 29.C e 29.D, os danos oxidativos (Fpg-SS) não apresentam nenhuma correlação com a indução desses processos biológicos nesse modelo bacteriano.

Apesar de termos obtido resultados positivos com o uso da linhagem de *E. coli* MBL50, na qual é proficiente em reparo de DNA, fazia-se necessária a obtenção de uma linhagem mais sensível à UV, na qual pudesse servir como melhor indicador dos efeitos biológicos aqui estudados. Com a obtenção dessa nova linhagem de *E.*

coli MBL50 deficiente em reparo de DNA, se tornaria possível aumentar os limites de detecção da nossa metodologia, principalmente em relação às baixas frequências de mutação induzidas pela luz solar natural.

4.9.2 Obtenção de cepas de *E. coli MBL50* mais sensíveis à UV mutadas para genes de reparo de DNA

Para de fato darmos início em nossos experimentos de avaliação dos efeitos biológicos induzidos pela luz solar, diferentes estratégias foram adotadas para a obtenção de uma cepa de *E. coli* mutada em genes de reparo de DNA, que fosse mais sensível à radiação UV e que servisse como um indicador biológico eficiente da genotoxicidade das lesões de DNA aqui estudadas. Desta forma, conseguimos construir uma cepa mutante de *E. coli MBL50*, deletada no gene *uvrA* da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), com a utilização da técnica de interrupção gênica descrita por Datsenko & Wanner, 2000 [77], que é descrita com detalhes em Materiais e Métodos. Com essa metodologia, várias colônias resistentes à canamicina foram obtidas, mas apenas algumas foram selecionadas, por terem apresentado maior sensibilidade à UV em experimentos de sobrevivência.

A Figura 30 mostra a região de inserção dos iniciadores no plasmídio *pKD4*, assim como, a reação de PCR para a confirmação do genótipo nas colônias selecionadas e a curva de sobrevivência para a verificação do fenótipo de sensibilidade à luz UV.

Figura 30: Disrupção do gene *uvrA* na cepa de *E. coli* MBL50. **A.** Mapa genético do plasmídeo *pKD4*, indicando o gene de resistência à canamicina e as posições dos iniciadores usados. **B.** Reação de PCR para a confirmação do genótipo de inserção do fragmento contendo o gene de resistência à canamicina no genoma bacteriano. **C.** Curva de sobrevivência para a confirmação do fenótipo de sensibilidade à luz UVC dos clones selecionados.

Na Figura 30.B é confirmada a obtenção da cepa *MBL50ΔuvrA*. A confirmação do genótipo foi realizada pela reação de PCR com duas colônias de clones selecionados e uma colônia da linhagem selvagem parental, usando os iniciadores kt e k2, onde o produto amplificado é uma região dentro do gene de resistência à canamicina contendo 471 nucleotídeos. Para certificar esse resultado, realizamos outra reação de PCR, usando os iniciadores *uvrA*-P1, que tem similaridade a uma região vizinha do gene alvo (gene *uvrA*) e também ao gene de resistência ao antibiótico canamicina (P1), junto com o iniciador k1, que se encontra numa região dentro do gene de resistência à canamicina. A confirmação do fenótipo esperado foi obtida através de uma curva de sobrevivência após irradiação com diferentes doses de luz UVC. Na Figura 30.C fica evidente a sensibilidade aumentada das bactérias selecionadas como mutantes para o gene *uvrA*. A cepa

Resultados

descrita como *MBL50uvrA*⁻⁵ foi escolhida para ser classificada como *MBL50ΔuvrA* e ser utilizada como indicadora dos efeitos genotóxicos das lesões de DNA induzidas pela luz solar.

Desta forma, a bactéria descrita acima foi avaliada quanto a sua sensibilidade de aplicação em experimentos de determinação da taxa de inativação de DNA e frequência de mutação, após a exposição do Dosímetro de DNA à luz solar. A Figura 31 mostra a comparação entre as linhagens de *E. coli* *MBL50*, proficiente em reparo e *MBL50ΔuvrA*, deficiente em reparo, na quantificação dos efeitos biológicos induzidos pela luz solar em São Paulo.

Figura 31: Comparação da sensibilidade de detecção dos efeitos biológicos induzidos pela luz solar na cidade de São Paulo entre as cepas de *E. coli* *MBL50* e *MBL50ΔuvrA* (exposição ambiental realizada em 25/04/2008). **A.** Experimento de determinação de fotoprodutos de DNA induzidos pela luz solar (exposição 25/04/2008). **B.** Quantificação das lesões de DNA induzidas pela luz solar. **C.** Taxas de inativação de DNA induzidas após exposições ambientais, através da utilização das cepas de *E. coli* *MBL50* e *MBL50ΔuvrA*. **D.** Frequências de mutação induzidas após exposições ambientais, através da utilização das cepas de *E. coli* *MBL50* e *MBL50ΔuvrA*.

Na figura 31.A, a indução dos diferentes tipos de lesões de DNA fica evidente, onde o aparecimento de DNA na forma circular relaxada (FII), após tratamento com as respectivas enzimas, surge apenas na triplicata de amostras expostas à luz solar. A quantificação dos danos mostra que CPDs são predominantes, mas também é verificada a indução 6-4PPs, assim como, danos oxidativos após a realização dessas exposições ambientais em São Paulo. A comparação dos resultados de inativação de DNA e de frequência de mutação, obtidos com a utilização das cepas *MBL50* e *MBL50ΔuvrA* apresentados nas Figuras 31.C e 31.D, mostra claramente que o plasmídeo é mais sensível aos efeitos biológicos da radiação solar, quando transfectado na cepa deficiente em *uvrA*.

4.9.3 Aplicação ambiental do sistema Dosímetro de DNA: exposições realizadas em diferentes latitudes do Brasil e da América do Sul

Através da cooperação científica desenvolvida ao longo desse projeto entre o Laboratório de Reparo de DNA da USP e as Universidades de Rikkyo e Takushoku do Japão, foi possível ampliar esse estudo para outras localidades além de São Martinho da Serra/RS, como: Punta Arenas, extremo sul do Chile (Latitude - 53° 1' S; Longitude - 70° 9' O), Natal/RN (latitude - 5° 47' S; Longitude - 35° 12' O) e, principalmente, São Paulo/SP (Latitude - 23° 32' S; Longitude - 46° 38' O) onde foi realizado o maior número de análises ambientais. Em todas as localidades mencionadas existem radiômetros específicos para radiação UVB e UVA solar (UV-B Radiometer e UV-A Radiometer, EKO Instruments Trading Co. Ltd., Japão) instalados pelo grupo colaborador japonês. A Figura 32 mostra o mapa das respectivas latitudes já estudadas nesse projeto de pesquisa.

Figura 32: Mapa das localidades das exposições ambientais realizadas em diferentes latitudes (indicadas no mapa) do Brasil e da América do Sul.

Resultados

Como já citado anteriormente, as exposições do Dosímetro de DNA à luz solar são contínuas, das 10:00 às 14:00 horas, e em dias de céu claro. A Tabela 3 mostra as condições das novas exposições ambientais realizadas com esse biodosímetro e a Figura 33 mostra um exemplo representativo da determinação das lesões de DNA após a realização de exposições ambientais do Dosímetro de DNA em Punta Arenas, São Paulo e Natal, respectivamente.

Tabela 3: Medidas de radiação UVB/UVA solar e temperatura máxima durante as exposições ambientais do Dosímetro de DNA.

Exposições ambientais (Latitudes)	10:00 – 14:00 UVB (kJ/m²) 280-315 nm	10:00 – 14:00 UVA (kJ/m²) 315-400 nm	Temperatura (°C)
06/10/2008 (53° 1'S)	2.9	401	10
08/10/2008 (53° 1'S)	2.7	362	12
09/10/2008 (53° 1'S)	2.3	357	11
27/12/2006 (29° 4'S)	5.2	191	23
29/12/2006 (29° 4'S)	4.8	177	26
04/01/2007 (29° 4'S)	2.3	81	24
25/04/2008 (23° 3'S)	14.6	518	27
03/06/2008 (23° 3'S)	10.2	397	17
01/07/2008 (23° 3'S)	8.0	341	18
21/07/2008 (23° 3'S)	9.3	357	20
18/08/2008 (23° 3'S)	11.8	443	25
05/12/2008 (23° 3'S)	23.7	780	29
08/12/2008 (23° 3'S)	19.4	625	27
27/02/2009 (5° 5'S)	32.5	867	39
28/02/2009 (5° 5'S)	31.5	819	36

Figura 33: Exemplo representativo de experimentos de determinação de lesões de DNA após exposições ambientais do Dosímetro de DNA nas cidades de Punta Arenas (53° 1' S), São Paulo (23° 3' S) e Natal (5° 5' S), respectivamente.

Resultados

Apesar da Figura 33 mostrar exposições realizadas em diferentes épocas do ano para cada cidade, a variação apresentada entre os perfis de lesões de DNA observada em cada latitude serve para indicar que a luz solar exerce efeitos distintos sobre a molécula de DNA, que variam de acordo com a posição geográfica.

Desta forma, para avaliarmos e qualificarmos o potencial genotóxico da radiação UV solar sobre a molécula de DNA, foram determinadas as porcentagens de indução de cada tipo de lesão, para todos os dias das exposições ambientais realizadas. Assim, torna-se possível qualificar o perfil de lesões de DNA observado numa determinada latitude e compará-lo com os perfis obtidos em outros lugares ou com os perfis verificados após o uso de lâmpadas no laboratório, por exemplo. A Tabela 4 mostra os perfis de indução de lesões de DNA gerados após as exposições ambientais em todas as latitudes estudadas neste trabalho e os mesmos obtidos após a exposição às lâmpadas de radiação UVB e UVA.

Tabela 4: Perfis de indução de lesões de DNA determinados após a realização de exposições ambientais do Dosímetro de DNA em diferentes latitudes da América do Sul e em condições controladas dentro do laboratório (lâmpadas de UVB e UVA).

Exposições ambientais (Latitudes)	SSB (%)	Fpg-SS (%)	T4-endo V-SS (%)	UVDE-SS (%)
06/10/2008 (53° 1' S)	8.0	28.0	31.1	33.1
08/10/2008 (53° 1' S)	6.4	28.0	32.0	34.1
09/10/2008 (53° 1' S)	6.0	27.6	31.4	35.0
27/12/2006 (29° 4' S)	2.3	25.0	29.3	43.4
29/12/2006 (29° 4' S)	2.0	25.0	29.0	44.0
04/01/2007 (29° 4' S)	2.7	22.7	30.7	44.0
25/04/2008 (23° 3' S)	0.8	15.5	36.6	47.1
03/06/2008 (23° 3' S)	0.6	16.4	35.2	48.0
01/07/2008 (23° 3' S)	0.7	16.2	37.2	46.0
21/07/2008 (23° 3' S)	0.8	19.6	36.0	44.0
18/08/2008 (23° 3' S)	0.9	17.3	37.0	45.0
05/12/2008 (23° 3' S)	2.7	10.3	39.1	48.0
08/12/2008 (23° 3' S)	1.6	9.3	39.6	49.5
27/02/2009 (5° 5' S)	1.2	5.1	36.3	57.3
28/02/2009 (5° 5' S)	0.9	5.1	35.7	58.3
UVB (6 kJ/m ²)	0.1	5.8	40.0	54.0
UVA(300 kJ/m ²)	0.6	18.2	35.0	46.7

Resultados

O resultado apresentado na Tabela 4 mostra claramente que a luz solar possui diferentes perfis de indução de lesões de DNA, que variam de acordo com as latitudes cujas exposições ambientais foram realizadas. Esta informação inédita, apesar de esperada, corrobora com a hipótese de que a genotoxicidade da luz solar varia com a localidade da irradiação. Isto significa que estamos observando uma tendência, na qual, a indução de danos oxidativos é diretamente dependente do aumento da latitude enquanto a indução de 6-4PPs é inversamente dependente.

Para apresentar mais claramente os diferentes perfis de lesões de DNA verificados em cada latitude e compará-los com as lâmpadas de radiação UVB e UVA aqui empregadas, a média das porcentagens de danos foi calculada e é apresentada na Figura 34.

Figura 34: Média e desvio padrão das porcentagens de lesões de DNA quantificadas em cada localidade e após tratamentos com lâmpadas de UVB (6 kJ/m²) e UVA (300 kJ/m²) no laboratório.

Um aspecto muito interessante que pode ser observado na Figura 34 foi a grande semelhança entre os perfis de indução de lesões de DNA da lâmpada de UVB e da cidade de Natal/RN. Qualitativamente, esse resultado revela o elevado potencial genotóxico da luz solar em baixas latitudes. Por outro lado, percebe-se que a luz solar em São Paulo se comporta, de uma maneira geral, muito semelhante a fonte de luz UVA utilizada. Já as outras duas localidades estudadas, São Martinho da Serra/RS e Punta Arenas/Chile, apresentaram um perfil de lesões de DNA único para cada localidade, sem grandes semelhanças às demais condições aqui

Resultados

avaliadas, apesar da média de porcentagem de Fpg-SS e T4-endo V-SS serem muito parecidas nessas duas localidades, com exceção da porcentagem de UVDE-SS.

Com o objetivo de comparar a quantidade de lesões de DNA geradas e as doses de radiação UVB/UVA medidas pelos radiômetros após as exposições ambientais nas diferentes latitudes estudadas, novas correlações foram feitas entre essas medidas de radiação e as quantidades de sítios sensíveis às enzimas Fpg, T4-endo V e UVDE quantificados para cada localidade. A Figura 35 apresenta a correlação estabelecida entre os sítios sensíveis às enzimas e as doses de radiação UVB/UVA solar.

Figura 35: Correlações entre a indução de quebras simples de DNA (SSB) e sítios sensíveis às enzimas Fpg (Fpg-SS), T4-endo V (T4-endo V-SS) e UVDE (UVDE-SS) com as doses de radiação UVB (A) e UVA (B) solar medidas pelos radiômetros, após cada exposição ambiental do Dosímetro de DNA nas diferentes latitudes estudadas.

Como pode ser observado no resultado acima, houve apenas correlações positivas entre a indução de T4-endo V-SS e UVDE-SS com as doses de radiação UVB/UVA solar apresentadas nas Tabelas 2 e 3. Ao compararmos esses valores com a indução de Fpg-SS e SSB, verificamos que não existem correlações. Ou seja, esse resultado corrobora com a hipótese de que a natureza química e a eficiência de formação dessas lesões de DNA dependem fortemente do comprimento de onda dos fótons incidentes, e não apenas de valores brutos de energia, seja para a radiação UVB como para a radiação UVA. Além disso, surpreendentemente, os coeficientes de correlação obtidos para as correlações entre T4-endo V-SS, UVDE-SS e as doses de UVB e UVA solar foram muito similares entre si, sugerindo que ambas as bandas de radiação UV solar teriam eficiências semelhantes em termos de indução de fotoprodutos de bipyrimidina.

Experimentos confirmatórios para os resultados de indução de lesões CPDs e 6-4PPs, obtidos com o uso das enzimas de reparo de DNA, também foram realizados com o uso de anticorpos específicos para essas lesões, nas amostras de DNA plasmidial expostas com o sistema Dosímetro de DNA nas diferentes latitudes estudadas. A Figura 36 mostra os experimentos de confirmação e quantificação dos fotoprodutos CPDs e 6-4PPs nas amostras de DNA plasmidial expostas à radiação solar em São Paulo, Punta Arenas e Natal.

Figura 36: Confirmação da presença de lesões CPDs e 6-4PPs. Detecção (A) e quantificação (B) do anticorpo anti-CPD (200 ng de DNA). Detecção (C) e quantificação (D) do anticorpo anti-6-4PP (200 ng de DNA).

Resultados

Esses resultados mostram que realmente existem variações nos perfis de indução dessas lesões de DNA após exposições do Dosímetro de DNA à luz solar em diferentes localidades. Desta forma, estes dados servem para confirmar a idéia de que a capacidade genotóxica da radiação UV solar incidente na superfície terrestre sofre variações de acordo com a localização geográfica no planeta, e corroboram a idéia de que a formação da lesão 6-4PP é mais eficiente em baixas latitudes.

Complementando as análises bioquímicas de confirmação da presença de lesões de DNA após as exposições ambientais, análises biológicas de inativação de DNA e de frequência de mutação foram determinadas com o uso da cepa *MBL50ΔuvrA*. Os valores desses efeitos genéticos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Determinação da taxa de inativação de DNA e da frequência de mutação após a realização das exposições ambientais em todas as latitudes estudadas.

Exposições ambientais (Latitudes)	Inativação de DNA (controle)	Inativação de DNA (expostos)	Frequência de mutação (controle)	Frequência de mutação (expostos)
06/10/2008 (53° 1' S)	1	8,8	3,7E-06	1,2E-03
08/10/2008 (53° 1' S)	1	5,0	2,8E-06	8,8E-04
09/10/2008 (53° 1' S)	1	3,2	1,2E-05	5,2E-04
27/12/2006 (29° 4' S)	1	39,6	3,2E-05	9,6E-03
29/12/2006 (29° 4' S)	1	30,6	2,6E-05	7,4E-03
04/01/2007 (29° 4' S)	1	8,0	4,5E-05	1,8E-03
25/04/2008 (23° 3' S)	1	74,1	1,3E-05	1,6E-02
03/06/2008 (23° 3' S)	1	71,0	6,5E-06	1,6E-02
01/07/2008 (23° 3' S)	1	9,6	1,3E-06	9,2E-04
21/07/2008 (23° 3' S)	1	18,2	5,6E-06	3,2E-03
18/08/2008 (23° 3' S)	1	104,0	1,4E-06	1,7E-02
08/12/2008 (23° 3' S)	1	119,3	2,2E-06	2,9E-02
27/02/2009 (5° 5' S)	1	149,2	1,4E-05	5,0E-02
28/02/2009 (5° 5' S)	1	127,8	1,8E-05	3,3E-02

A Tabela 5 evidencia que os maiores valores desses efeitos biológicos foram encontrados nas exposições realizadas nas menores latitudes, principalmente em Natal/RN. Dentro dessa mesma análise, vale destacar os elevados valores para esses efeitos genéticos observados nas últimas exposições ambientais realizadas em São Paulo. Nessas duas localidades, foram observadas as maiores quantidades

Resultados

de fotoprodutos de DNA, principalmente T4-endo V-SS e UVDE-SS, o que ressalta a genotoxicidade da luz solar nessas latitudes.

Pelo fato de termos apresentado correlações entre as medidas de radiação UVB/UVA solar feitas pelos radiômetros e os sítios sensíveis às enzimas para todas as latitudes estudadas, novas correlações também foram feitas entre esses valores de doses de radiação solar, porém agora com os resultados dos efeitos biológicos (inativação de DNA e mutagênese), com o propósito de avaliarmos a genotoxicidade de cada banda de UV da luz solar, separadamente. Esses resultados são apresentados na Figura 37.

Figura 37: Correlações entre indução de inativação de DNA (A) e frequência de mutação (B) com as doses de radiação UVB solar e correlações entre indução de inativação de DNA (C) e frequência de mutação (D) com as doses de radiação UVA solar. Os valores de doses de radiação e dos respectivos efeitos biológicos representam todas as exposições ambientais do Dosímetro de DNA realizadas nas diferentes latitudes estudadas.

Surpreendentemente, a Figura 37 indica que ambos os efeitos biológicos, inativação de DNA e mutagênese, apresentam coeficientes de correlação similares,

tanto para as doses de radiação UVB quanto para as de UVA solar, sendo que os mesmos são sutilmente maiores para as doses de UVA. Complementado esse resultado, coeficientes de correlação semelhantes também foram observados nas correlações entre as doses de radiação UVB/UVA solar e os T4-endo V-SS e UVDE-SS (Figura 35). Desta forma, esses resultados indicam que, através de uma análise global, apesar de estarmos trabalhando apenas com dados obtidos na América do Sul, não houve diferença entre as ações genotóxicas induzidas pelas bandas de radiação UVB e UVA solar. Vale ressaltar que esses resultados são totalmente distintos daqueles obtidos com as fontes artificiais de radiação UVB e UVA. Na Figura 14, quando a ação biológica de cada banda de UV foi analisada separadamente, dentro das condições controladas no laboratório, o maior potencial genotóxico da luz UVB em relação à luz UVA é claramente visível. Portanto, os resultados descritos acima são uma indicativa forte de que a divisão dos comprimentos de onda da radiação UV solar, entre bandas de UVB e UVA, não se aplica com a mesma eficiência no meio ambiente quando comparada às condições artificiais do laboratório.

Nós também estamos trabalhando no sequenciamento do gene *supF* das amostras do vetor *pCMUT*. Desta forma, esperamos fornecer dados inéditos sobre as assinaturas moleculares da luz solar na molécula de DNA (perfis de lesão de DNA e espectros de mutagênese) e comparar os seus efeitos genotóxicos entre as diferentes latitudes e longitudes estudadas.

5 Discussão

Atualmente, existem muitas evidências indicando que a luz solar é um agente carcinogênico e, em termos absolutos, este é um dos mais importantes cuja população humana está exposta. Em consequência da redução da concentração da camada de ozônio, espera-se que o aumento da intensidade de radiação UV na superfície terrestre provoque um impacto direto sobre a saúde dos seres humanos, sobretudo na pele. Essa expectativa existe pelo fato da exposição excessiva à radiação UV solar ser o principal responsável pelo aparecimento de tumores de pele e pelo seu envelhecimento prematuro [14].

Entretanto, a indução relativa de lesões CPDs e 6-4PPs pela radiação UV solar e suas contribuições em processos biológicos vem sendo matéria de debates por mais de 20 anos. Isto se dá pelo fato de existirem enormes discrepâncias entre estudos científicos, os quais tentam simular condições naturais de irradiação.

Nesse projeto, nós examinamos a indução de lesões de DNA após exposições a fontes artificiais de radiação UV, utilizando diferentes métodos de exposição de amostras de DNA, e também diretamente na luz solar em diferentes latitudes. Para a realização de exposições ambientais fez-se necessário o desenvolvimento de um novo sistema de exposição de amostras de DNA à luz solar, que denominamos Dosímetro de DNA (P.I. 0.705.124-7 de 17/10/2007) (Figura 17). Para desenvolver esse sistema, uma busca foi realizada para encontrar o material que apresentasse as características mais adequadas, tais como: (i) alta transmitância para os comprimentos de onda da radiação UVB e UVA; (ii) resistência às adversidades ambientais, evitando coloração indesejada e perda da transparência do material; (iii) possibilidade de mudar a forma do molde do sistema de exposição de DNA de acordo com os objetivos do experimento; (iv) e baixo custo. Etapas experimentais preliminares de exposições de amostras de DNA a fontes artificiais de UV foram cruciais para o surgimento de novas idéias sobre materiais e formatos de um possível sistema de exposição à luz solar, até chegarmos ao protótipo descrito acima.

Desta forma, essas etapas preliminares serviram também para entendermos melhor a respectiva contribuição de cada banda da radiação UV (UVC, UVB e UVA) e os seus efeitos genotóxicos no modelo de *E. coli* descrito ao longo desse trabalho.

Sendo assim, foi de nosso interesse determinar os perfis de indução de lesões de DNA em amostras do vetor *pCMUT*, que transporta o gene *supF*, após exposições à luz UVC, UVB, UVA. É importante ressaltar que esses perfis de danos de DNA já haviam sido determinados e descritos na literatura, quando foram realizadas exposições de DNA plasmidial em placas de Petri à luz UVC, UVB, UVA e simulador solar, uso de enzimas de reparo de DNA e do método de relaxamento de plasmídeo aqui descrito [8]. Aqui, usando basicamente a mesma metodologia, nós conseguimos observar a indução de T4-endo V-SS em todas as amostras de DNA irradiadas com as lâmpadas de UV (UVC, UVB e UVA), demonstrando a formação de CPDs (Figura 13). Nesse caso, a indução de CPDs pela luz UVB foi muito elevada e similar ao tratamento com UVC (Figura 13.A; Figura 13.B). Nós também mostramos evidências que CPDs são formados quando amostras de DNA plasmidial são irradiadas com luz UVA dentro de placas de Petri (Figura 13.C). Contudo, tanto a sua eficiência de produção como o perfil de indução de lesões de DNA observado após a irradiação com UVA nessa condição foram muito diferentes dos resultados obtidos com o Dosímetro de DNA (Figura 18.B; Figura 19.B).

A maior quantidade de danos oxidativos gerados por UVA em comparação a UVC e UVB (Figura 13) pode estar relacionada a possibilidade de radicais hidroxilas terem sido produzidos por reações de Fenton, sugerindo a presença de metais, tais como ferro e cobre, ligados a molécula de DNA [8]. Entretanto, quando amostras de DNA plasmidial foram expostas a mesma fonte de luz UVA, dentro do Dosímetro de DNA, a quantidade de Fpg-SS foi significativamente menor para doses similares de radiação UVA (Figura 18.B; Figura 19.B). A maior indução de danos oxidativos e quebras simples de DNA observados nas amostras irradiadas com luz UVA dentro de placas de Petri (Figura 13.C), pode ser explicada pela presença de cromóforos contaminantes nessas placas de plástico. Na verdade, essa hipótese foi levantada anteriormente, quando a formação de peróxido de hidrogênio foi detectada na solução de DNA armazenada em placas de Petri de plástico após a irradiação com luz UVA, mas, surpreendentemente, não houve detecção quando esse mesmo procedimento foi realizado em placas de Petri de vidro, as quais tiveram a sua superfície limpa [8].

Com o desenvolvimento do sistema Dosímetro de DNA e através do uso de enzimas de reparo de DNA e anticorpos específicos, foi possível reavaliar os

diferentes tipos de lesões de DNA, utilizando quantidades relativamente baixas de amostras de DNA plasmidial. Desta forma, após as exposições desse sistema à radiação UVB e UVA apenas, foi possível detectar a indução de T4-endo V-SS em todas as amostras de DNA irradiadas, confirmando os nossos resultados anteriores e sugerindo a formação de CPDs. De acordo com artigos previamente publicados [8, 11, 15, 24, 27, 28, 80], com a aplicação desse sistema nós não apenas apresentamos evidências de que CPDs são formados pela radiação UVA, como também mostramos que este é o tipo de lesão de DNA mais induzido por estes comprimentos de onda (Figura 18; Figura 19). A diferença entre esse resultado e o obtido com a irradiação feita dentro de placas de plástico reflete a alta transparência do material utilizado no sistema desenvolvido nesse trabalho. Também consistente com estudos prévios [8, 23, 46, 81], a exposição à lâmpada de UVA gerou um significativo número de danos oxidativos (Fpg-SS), sendo a indução por UVA maior do que a observada após as exposições com UVB, quando comparada aos demais fotoprodutos (Figura 18; Figura 19). Porém, a quantidade de Fpg-SS gerada nas amostras expostas à luz UVA dentro do Dosímetro de DNA, o qual foi extensivamente limpo com detergente e álcool 70% antes de cada tratamento, foi significativamente menor quando comparada aquelas expostas a esses comprimentos de onda dentro de placas de Petri. Esse resultado confirma que, realmente, diferentes sistemas de exposição de amostras biológicas a fontes de radiação UV podem contribuir de maneiras distintas em processos de indução de danos de DNA. Portanto, as discrepâncias aqui observadas refletem um pouco da questão por trás das discussões focadas em temas complicados dentro da fotobiologia, como é o caso das diferentes eficiências de indução de lesões de DNA pela luz UVA que vem sendo relatadas principalmente ao longo das duas últimas décadas. Outro fator surpreendente nos experimentos de exposição do Dosímetro de DNA foi a maior frequência de UVDE-SS em relação à de T4-endo V-SS após as exposições com as lâmpadas de radiação UVB e UVA, sugerindo que outro tipo de fotoproduto foi formado em adição aos CPDs nessas amostras de DNA plasmidial, possivelmente 6-4PPs (Figura 18; Figura 19).

Desta forma, anticorpos específicos para as lesões CPDs e 6-4PPs foram utilizados com o objetivo de confirmar a indução desses fotoprodutos nas amostras de DNA expostas a estes comprimentos de onda. Nossos resultados confirmam

claramente a indução de lesões CPDs e 6-4PPs após exposições do sistema Dosímetro de DNA às lâmpadas de UVB e UVA (Figura 22). Porém, é importante ressaltar que a detecção de 6-4PPs após a exposição à luz UVA foi muito menor do que a quantidade de 6-4PPs induzida por UVB, quando comparado aos resultados obtidos com as enzimas de reparo de DNA. Essa observação, pode ser explicada pela alta especificidade do anticorpo anti-6-4PP, o que poderia resultar numa diferença relativa na quantidade de lesão detectada por essas diferentes técnicas bioquímicas (enzimas *versus* anticorpos). Embora, se esse for o caso, os resultados obtidos com a enzima UVDE podem, de fato, ser explicados também pela presença de outros tipos de lesões induzidas apenas pela luz UVA e luz solar, cujo anticorpo anti-6-4PP não é capaz de detectar, devido a sua alta especificidade. Portanto, considerando que a conversão de 6-4PPs para Dewar-PPs pelos comprimentos de onda de UVA já foi previamente descrita [27], é muito sensato propor que um terceiro fotoproduto poderia ser DewarPPs, substrato conhecido da enzima UVDE [82].

Experimentos suplementares foram realizados para confirmar que a indução de danos oxidativos pela radiação UVA não era devido à presença de cromóforos contaminantes do processo de extração de DNA e que esses comprimentos de onda realmente induzem lesões 6-4PPs na molécula de DNA. Portanto, novas amostras de DNA plasmidial foram purificadas através da técnica de ultracentrifugação com gradiente de CsCl. Os resultados obtidos mostram que tanto os espectros de absorção de luz como os perfis de indução de lesões de DNA dessas amostras são muito semelhantes aos observados nas amostras de DNA extraídas com o kit comercial Quiagen maxi kit, tornando improvável a possibilidade de algum contaminante causar a indução de danos oxidativos (Figura 20). Para confirmar que a maior quantidade de UVDE-SS em relação aos T4-endo V-SS não era devido à presença de sítios AP induzidos pela luz UVA, foi utilizada a enzima Nfo para avaliar a contribuição dessa lesão em relação aos demais fotoprodutos já estudados. Os resultados mostram que a indução de sítios AP pela luz UVA foi muito baixa, eliminando a possibilidade de essa ser uma lesão de DNA frequente após exposições a esses comprimentos de onda (Figura 21). Concluindo esses experimentos, uma terceira metodologia foi adaptada para confirmar novamente a indução de 6-4PPs pela luz UVA. A irradiação de amostras de DNA plasmidial

seguida de tratamento alcalino mostrou um aumento dose-dependente de lesões 6-4PPs (Figuras 23.A; Figura 23.B), confirmando a indução dessas lesões de DNA pela luz UVA. Portanto, através da aplicação da tecnologia aqui desenvolvida, demonstramos um novo perfil de indução de lesões de DNA pelos comprimentos de onda de UVA, caracterizado pela presença de danos oxidativos (Fpg-SS), CPDs (T4-endo V-SS, UVDE-SS e anti-CPD) e 6-4PPs (UVDE-SS, anti-6-4PP e tratamento alcalino).

Com o objetivo de investigar a relevância biológica desses resultados, foram realizados experimentos com culturas de células de mamíferos nas mesmas condições em que as amostras de DNA plasmidial foram expostas. Os resultados obtidos com culturas de células CHO estão de acordo com os dados já previamente publicados [27], nos quais mostram que a indução de 6-4PPs pela luz UVA no DNA dessas células é significativamente pequena, praticamente indetectável, em relação à indução deste mesmo tipo de lesão pela luz UVB e indução de CPDs tanto pela luz UVB quanto UVA (Figura 24).

Porém, decidimos verificar se os mecanismos de reparo de DNA poderiam estar impedindo a detecção de 6-4PPs após a irradiação com luz UVA, devido ao fato do reparo dessa lesão ser reconhecidamente muito rápido e a irradiação com a lâmpada de UVA ser muito longa, aproximadamente 1h e 30min. Para isso, foram utilizadas as culturas de células de fibroblastos humanos MRC5 (proficiente em reparo de DNA) e XP12RO (deficiente em reparo de DNA, mutada no gene XPA). Os resultados obtidos com o uso dos anticorpos anti-CPD e anti-6-4PP, revelam que as amostras de DNA provenientes das células deficientes em reparo apresentam mais lesões que o DNA das células proficientes, após o tratamento com luz UVB e UVA. Surpreendentemente, a análise da indução de 6-4PP pela luz UVA mostra que essa lesão é detectada apenas no DNA da linhagem XP12RO, indicando que a falta de reparo de DNA dessas células permite que a lesão seja identificada pelo método imunológico aplicado nesse trabalho (Figura 25). O resultado também revela que a indução desses tipos de lesões nas amostras de DNA plasmidial foi mais pronunciada do que a verificada nas culturas de fibroblastos humanos (Figura 25). Isto serve para ressaltar o fato de que o sistema Dosímetro de DNA é uma ferramenta extremamente sensível para a detecção desses tipos de lesões de DNA induzidas por fontes de radiação UV.

O gene *supF* de *E. coli* tem sido extensivamente usado como alvo mutagênico em diversos estudos que aplicam vetores plasmidiais. O uso extenso desse gene de tRNA supressor produziu um grande banco de dados de espectros de mutações induzidos por diferentes agentes que provocam danos na molécula de DNA, através da sua aplicação como gene repórter de mutações em células de mamíferos, leveduras, *E. coli* e camundongos transgênicos [78, 83-85].

Através do uso do método de resistência a L-arabinose, foi possível detectar baixas frequências de mutações na cepa *MBL50* proficiente em reparo de DNA, permitindo o uso do gene *supF* para estudos de mutagênese induzida por luz UVA, por exemplo. Assim, para esse tipo de experimento, as amostras de DNA expostas à luz UVC, UVB, UVA e luz solar foram transfectadas nessa linhagem para a realização de análises de inativação de DNA e mutagênese. As suas quantificações mostraram que ambos efeitos induzidos por luz UVA (Figuras 14.C ; Figura 14.F) foram significativamente menores quando comparados aos tratamentos com luz UVC e UVB (Figuras 14.A ; Figura 14.D ; Figura 14.B; Figura 14.E, respectivamente), indicando a baixa eficiência de produção de CPDs pela luz UVA quando amostras de DNA são expostas dentro de placas de Petri. Já os efeitos genotóxicos induzidos pela luz solar em São Martinho da Serra/RS (Figura 28), estão em total acordo com as medidas de doses de radiação UVB/UVA solar feitas pelos radiômetros (Tabela 2) e com as quantidades de lesões de DNA observadas para cada dia de exposição (Figura 26; Figura 27).

Portanto, com o objetivo de investigar a contribuição de lesões CPDs (T4-endo V-SS) e danos oxidativos (Fpg-SS) na indução de inativação de DNA e frequência de mutação, foram realizadas correlações entre esses dados, considerando as primeiras exposições às fontes artificiais de UV e luz solar realizadas. Os coeficientes de correlação obtidos mostram claramente que existe uma relação direta entre a eficiência de produção de CPDs, pelas diferentes fontes de radiação UV, e a indução dos efeitos biológicos. Além disso, o resultado sugere que as magnitudes das respostas de inativação de DNA e mutagênese, nesse modelo de *E. coli*, estão apenas relacionadas com a quantidade de lesões CPDs geradas, sem haver nenhuma indicação de associação com a produção de danos oxidativos (Figura 29).

Embora a utilização da cepa de *E. coli* MBL50 tenha provido os resultados positivos descritos acima, o seu uso limitou o objetivo de se obter o espectro mutagênico das amostras de DNA expostas à luz solar natural, principalmente devido às baixas frequências de mutação obtidas nesses experimentos de campo. Desta forma, para contornar esse problema, foi obtida a cepa de *E. coli* MBL50 Δ *uvrA*, que é deletada no gene *uvrA*, através da técnica de disrupção gênica descrita com detalhes no Materiais e Métodos (Figura 30). A aplicação da bactéria descrita acima foi avaliada quanto a sua sensibilidade em experimentos de determinação da taxa de inativação de DNA e frequência de mutação, após a exposição do Dosímetro de DNA à luz solar em São Paulo. Os resultados obtidos nesses experimentos mostram claramente que o plasmídeo é mais sensível aos efeitos biológicos da radiação solar, quando transfetado na cepa deficiente em reparo de DNA (Figura 31).

Atualmente, a aplicação do sistema Dosímetro de DNA tem sido voltada para a avaliação dos efeitos genotóxicos da radiação UVB e UVA diretamente no meio ambiente. Paralelamente, com a instalação de radiômetros específicos para o monitoramento da radiação UV solar, torna-se possível comparar as respostas biológicas fornecidas pela nossa tecnologia com os dados físicos de incidência de energia desses comprimentos de onda na superfície terrestre, numa determinada localização geográfica. Desta forma, experimentos ambientais já foram realizados em diferentes latitudes do Brasil e da América do Sul, como: Punta Arenas, extremo sul do Chile (Latitude - 53° 1' S; Longitude - 70° 9' O); São Martinho da Serra/RS (Latitude - 29° 44' S; Longitude - 53° 82' O); São Paulo/SP (Latitude - 23° 32' S; Longitude - 46° 38' O); e Natal/RN (latitude - 5° 47' S; Longitude - 35° 12' O). Em todas as localidades mencionadas existem radiômetros específicos instalados pelo grupo colaborador japonês em instituições e centros de pesquisas, como parte de uma rede mundial de monitoramento da radiação UV solar.

Através da comparação entre as respostas físicas de doses de radiação UVB/UVA solar fornecidas pelos radiômetros (Tabela 2; Tabela 3) com os dados de porcentagens das diferentes fotolesões de DNA obtidos após as exposições do Dosímetro de DNA em diferentes latitudes (Tabela 4), foi possível observar uma clara modificação nos perfis de indução de lesões de DNA entre essas localidades. Essa variação fica mais clara quando analisamos a média dos perfis de lesões de

DNA para as exposições ambientais e para os tratamentos com as lâmpadas de UVB e UVA (Figura 34). As variações observadas entre os diferentes locais de exposições ambientais sugere que diferentes espectros de luz solar resultam em diferentes processos de formação de lesões na molécula de DNA. Isto significa que a genotoxicidade da luz solar sofre variações, podendo aumentar ou diminuir dependendo da posição geográfica no planeta (Figura 33). Ou seja, os resultados aqui apresentados indicam uma tendência, na qual, a indução de danos oxidativos é diretamente dependente do aumento da latitude enquanto a indução de 6-4PPs (%UVDE-SS - %T4-endo V-SS) é inversamente dependente, corroborando com a hipótese de que a natureza química e a eficiência de formação dessas lesões de DNA dependem fortemente da combinação de comprimentos de onda dos fótons incidentes e não apenas de valores brutos de energia, seja para a radiação UVB como para a radiação UVA (Figura 35).

Seguindo esse raciocínio, curiosamente, o perfil de lesões de DNA observado em Punta Arenas indica que, apesar do claro impacto da luz UVA na indução de lesões de DNA nessas amostras, houve uma maior indução de lesões oxidativas nessas amostras do que naquelas irradiadas com a própria lâmpada de UVA dentro do laboratório (Figura 34). Além disso, a semelhança observada entre os perfis de indução de danos da lâmpada de UVB e da cidade de Natal/RN (Tabela 4; Figura 34), é um exemplo excelente para contextualizarmos essa problemática. Pois, na latitude de 5° 5' Sul, verificamos as maiores doses de UV (tanto para UVB quanto para UVA – Tabela 3), mas o perfil de indução de lesões de DNA observado indica que o elevado potencial genotóxico dos menores comprimentos de onda da radiação UV solar se sobrepõe aos maiores na cidade de Natal, sendo essa genotoxicidade observada apenas com a realização de experimentos em condições controladas dentro do laboratório com o uso de lâmpada de radiação UVB. No caso de São Paulo, verificamos que existe uma maior participação de danos oxidativos no perfil total de lesões de DNA, havendo uma semelhança muito grande com o perfil obtido após os tratamentos com a lâmpada de UVA. Já as proporções de danos verificadas em São Martinho da Serra/RS e Punta Arenas/Chile, foram muito particulares para cada região. Onde, na primeira, verificamos uma grande proporção de danos oxidativos, assim como de 6-4PPs. Por outro lado, na segunda cidade, a quantidade

de 6-4PPs é muito pequena, mas os danos oxidativos representam uma grande parte da quantidade total de lesões de DNA (Tabela 4; Figura 34).

Em seguida, novos experimentos foram realizados com o uso de anticorpos específicos para confirmar a presença de lesões CPDs e 6-4PPs nas amostras de DNA plasmidial expostas nas cidades de São Paulo, Punta Arenas e Natal, e para comparar a eficiência de indução de CPDs e 6-4PPs pela luz solar nessas diferentes localidades. Os resultados obtidos mostram que a eficiência de formação dessas lesões de DNA varia principalmente de acordo com a dose de radiação UVB solar incidente nas diferentes latitudes (Figura 36). Este fato fica mais evidente quando a marcação do anticorpo anti-6-4PP é analisada separadamente (Figura 36.C; Figura 36.D), onde a indução desse fotoproduto mutagênico aumenta consideravelmente de acordo com a diminuição da latitude. Esse resultado também confirma os resultados com as enzimas de reparo de DNA, onde as diferenças entre as porcentagens de UVDE-SS e T4-endo V-SS foram pequenas para as exposições realizadas na cidade de Punta Arenas e elevadas para as da cidade de Natal.

Com a construção da cepa *MBL50ΔuvrA* (Figura 30), obteve-se um indicador biológico muito mais sensível para ser aplicado na avaliação dos efeitos genotóxicos induzidos pela radiação UV solar (Figura 31). Desta forma, com o uso dessa nova linhagem de *E. coli*, verificamos que o aumento das respostas biológicas, aqui representadas pela inativação de DNA e frequência de mutação, aparentemente está associado com a presença de fotoprodutos de bipyrimidina, representados por T4-endo V-SS e UVDE-SS, nas amostras de DNA plasmidial expostas em todas as localidades estudadas (Tabela 5). Vale lembrar que esses fotoprodutos correlacionam muito bem com a incidência de radiação UVB e UVA solar (Figura 35), o que sugere que ambas as bandas do espectro da radiação UV solar podem ser responsáveis pela indução desses tipos de lesões de DNA nas amostras expostas em diferentes cidades da América do Sul. Contudo, a confirmação dessa observação só foi reforçada através de novas correlações entre os efeitos genotóxicos, estudados na cepa de *E. coli MBL50ΔuvrA*, com as doses de radiação UVB/UVA solar monitoradas pelos radiômetros nessas localidades. Sendo assim, após a realização dessas análises, curiosamente, percebemos que ambos efeitos biológicos também apresentam boas correlações com as doses de radiação UVB e UVA solar (Figura 37).

Analisando esses resultados de uma maneira global (Figura 35; Figura 37), apesar de estarmos estudando o impacto da luz solar apenas na América do Sul, podemos sugerir que as doses de radiação UVA solar aqui monitoradas exerceram um impacto biológico similar às doses de radiação UVB. Isso significa que tanto a indução de fotoprodutos, avaliada pelo uso do Dosímetro de DNA, como a indução dos efeitos genotóxicos no modelo bacteriano aqui aplicado, são igualmente dependentes da incidência de radiação UVB e UVA solar na superfície terrestre. Portanto, esses resultados indicam que a clássica divisão dos comprimentos de onda da radiação UV (UVC, UVB e UVA), na qual é baseada na resposta biológica dos comprimentos de onda de cada banda, não se aplica com a mesma eficiência para a luz solar.

Seguindo esse mesmo raciocínio, percebemos que, possivelmente, a tentativa de reproduzir as condições naturais de irradiação solar, que sofre variações espectrais diárias dependentes de diversos fatores ambientais, com simuladores solar em laboratório, pode estar levando a possíveis enganos de interpretação da ação biológica da luz solar, nos quais podem estar relacionados à produção de substâncias fotoprotetoras menos eficientes do que deveriam ser. Desta forma, talvez uma nova e simples abordagem didática que considere a incidência e o impacto biológico dos comprimentos de onda da radiação UVB e UVA solar no mesmo patamar e que também evite considerar a radiação UVB um fator ambiental diferente e/ou independente da radiação UVA solar, possa vir a somar em termos de desenvolvimento de substâncias fotoprotetoras mais eficientes, como por exemplo, através do desenvolvimento de novos filtros de amplo espectro de proteção. Assim, uma nova classificação que nos agrada, seria a simples divisão em “Radiação UV Não-Terrestre”, para os comprimentos de onda da radiação UVC, e “Radiação UV Terrestre” para todos os fótons de UV incidentes na superfície (ou seja, UVB e UVA), sem distinção de níveis de ação biológica entre esses.

Também, esses resultados servem para complementar dados previamente publicados pelo nosso grupo [21], nos quais destacam o potencial genotóxico da radiação UVA, através da divulgação de um novo perfil de indução de danos de DNA por esses comprimentos de onda.

6 Conclusão

Considerando que um dos critérios mais importantes para a validação de um dosímetro biológico é a relevância da sua resposta fotobiológica/fotoquímica, é importante destacar que, sendo a molécula de DNA o alvo chave da radiação UV e, conseqüentemente, de seus efeitos biológicos, o Dosímetro de DNA aqui descrito apresenta uma importância genuína. Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que esse sistema é eficiente para indicar a quantidade e a natureza de uma lesão de DNA específica induzida pela luz solar. Adicionalmente, as amostras de DNA plasmidial expostas à luz solar podem ser transformadas em bactérias, fornecendo maneiras de avaliar os seus efeitos biológicos, além de permitir a determinação do espectro mutagênico do gene *supF* do vetor *pCMUT*, por técnicas relativamente simples. Portanto, a elaboração desse projeto permitiu o desenvolvimento de um sistema eficiente, confiável e capaz de prover uma ampla compreensão da ação biológica da luz solar sobre a molécula de DNA.

O uso do sistema Dosímetro de DNA está sob a proteção da patente P.I. 0.705.124-7 de 17/10/2007.

Referências

- [1] Takahashi A, Ohnishi T. The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station. *Biol Sci Space*. 2004 Dec;18(4):255-60.
- [2] Cockell CS. Ultraviolet radiation and the photobiology of earth's early oceans. *Orig Life Evol Biosph*. 2000 Oct;30(5):467-99.
- [3] Goosen N, Moolenaar GF. Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)*. 2008 Mar 1;7(3):353-79.
- [4] Stary A, Sarasin A. Ultraviolet A- and singlet oxygen-induced mutation spectra. *Methods Enzymol*. 2000;319:153-65.
- [5] Darwin C. *The Origin of Species*. London: John Murray 1859.
- [6] Ohno S. The reason for as well as the consequence of the Cambrian explosion in animal evolution. *J Mol Evol*. 1997;44 Suppl 1:S23-7.
- [7] Batista LF, Kaina B, Meneghini R, Menck CF. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*. 2009 Mar-Jun;681(2-3):197-208.
- [8] Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):71-80.
- [9] Frederick JE, Lubin D. *Solar ultraviolet irradiance at Palmer Station, Antarctica. Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects* 1994.
- [10] Munakata N, Cornain S, Kanoko M, Mulyadi K, Lestari S, Wirohadidjojo W, et al. Biological monitoring of solar UV radiation at 17 sites in Asia, Europe and South America from 1999 to 2004. *Photochem Photobiol*. 2006 May-Jun;82(3):689-94.
- [11] 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 U S A*. 2006 Sep 12;103(37):13765-70.

Referências

- [12] Setlow RB. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Sep;71(9):3363-6.
- [13] Freeman SE, Hacham H, Gange RW, Maytum DJ, Sutherland JC, Sutherland BM. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(14):5605-9.
- [14] Tsilimigaki SI, Messini-Nikolaki N, Kanariou M, Piperakis SM. A study on the effects of seasonal solar radiation on exposed populations. *Mutagenesis*. 2003 Mar;18(2):139-43.
- [15] Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res*. 2005 Apr 1;571(1-2):19-31.
- [16] Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 1;90(9):4216-20.
- [17] Piette J, Merville-Louis MP, Decuyper J. Damages induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem Photobiol*. 1986 Dec;44(6):793-802.
- [18] Darr D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*. 1994 May;102(5):671-5.
- [19] Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem*. 1992 Jan 5;267(1):166-72.
- [20] Epe B. Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact*. 1991;80(3):239-60.
- [21] Schuch AP, da Silva Galhardo R, de Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CF. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2009 Jan;8(1):111-20.
- [22] Runger TM, Kappes UP. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008 Feb;24(1):2-10.
- [23] Song JM, Milligan JR, Sutherland BM. Bistranded oxidized purine damage clusters: induced in DNA by long-wavelength ultraviolet (290-400 nm) radiation. *Biochemistry*. 2002 Jul 9;41(27):8683-8.

Referências

- [24] Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*. 2003 Aug 5;42(30):9221-6.
- [25] Kappes UP, Luo D, Potter M, Schulmeister K, Runger TM. Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J Invest Dermatol*. 2006 Mar;126(3):667-75.
- [26] Yoon JH, Lee CS, O'Connor TR, Yasui A, Pfeifer GP. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J Mol Biol*. 2000 Jun 9;299(3):681-93.
- [27] Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*. 2000 Sep 1;275(35):26732-42.
- [28] Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, et al. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)*. 2005 Jul 12;4(7):836-44.
- [29] Dunn J, Potter M, Rees A, Runger TM. Activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway and recombination repair in the cellular response to solar ultraviolet light. *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66(23):11140-7.
- [30] You YH, Lee DH, Yoon JH, Nakajima S, Yasui A, Pfeifer GP. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):44688-94.
- [31] Donahue BA, Yin S, Taylor JS, Reines D, Hanawalt PC. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;91(18):8502-6.
- [32] Chigancas V, Miyaji EN, Muotri AR, de Fatima Jacysyn J, Amarante-Mendes GP, Yasui A, et al. Photorepair prevents ultraviolet-induced apoptosis in human cells expressing the marsupial photolyase gene. *Cancer Res*. 2000 May 1;60(9):2458-63.
- [33] de Lima-Bessa KM, Armelini MG, Chigancas V, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, et al. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2008 Feb 1;7(2):303-12.

Referências

- [34] Matic I, Taddei F, Radman M. Survival versus maintenance of genetic stability: a conflict of priorities during stress. *Res Microbiol.* 2004 Jun;155(5):337-41.
- [35] Sutton MD, Smith BT, Godoy VG, Walker GC. The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet.* 2000;34:479-97.
- [36] Batty DP, Wood RD. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene.* 2000 Jan 11;241(2):193-204.
- [37] Verhoeven EE, van Kesteren M, Moolenaar GF, Visse R, Goosen N. Catalytic sites for 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC. *J Biol Chem.* 2000 Feb 18;275(7):5120-3.
- [38] Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature.* 1968 May 18;218(5142):652-6.
- [39] Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science.* 1999 Dec 3;286(5446):1897-905.
- [40] Friedberg EC. Cockayne syndrome--a primary defect in DNA repair, transcription, both or neither? *Bioessays.* 1996 Sep;18(9):731-8.
- [41] de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1999 Apr 1;13(7):768-85.
- [42] Hess MT, Schwitter U, Petretta M, Giese B, Naegeli H. Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):6664-9.
- [43] Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:43-81.
- [44] Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* 2003 Nov;85(11):1083-99.
- [45] Runger TM. How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: the role of cellular damage responses. *J Invest Dermatol.* 2007 Sep;127(9):2103-5.
- [46] Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res.* 2005 Apr 1;571(1-2):3-17.

Referências

- [47] de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol.* 2000;319:359-66.
- [48] Stary A, Robert C, Sarasin A. Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. *Mutat Res.* 1997 Jan 31;383(1):1-8.
- [49] Drobetsky EA, Turcotte J, Chateaufneuf A. A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 14;92(6):2350-4.
- [50] Pastila R, Leszczynski D. Ultraviolet A exposure might increase metastasis of mouse melanoma: a pilot study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2005 Aug;21(4):183-90.
- [51] Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res.* 2005 Apr 1;571(1-2):107-20.
- [52] Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6666-70.
- [53] Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol.* 2001 May;44(5):837-46.
- [54] Dondi D, Albin A, Serpone N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial sunscreens and consequent loss of UV protection. *Photochem Photobiol Sci.* 2006 Sep;5(9):835-43.
- [55] Westerdahl J, Ingvar C, Masback A, Jonsson N, Olsson H. Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UV-A carcinogenicity. *Br J Cancer.* 2000 May;82(9):1593-9.
- [56] Gasparro FP. Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy. *Environ Health Perspect.* 2000 Mar;108 Suppl 1:71-8.
- [57] Diffey B. Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. *Phys Med Biol.* 2004 Jan 7;49(1):R1-11.
- [58] Rozema J, Boelen P, Blokker P. Depletion of stratospheric ozone over the Antarctic and Arctic: Responses of plants of polar terrestrial ecosystems to enhanced UV-B, an overview. *Environ Poll.* 2005;137:428-42.

Referências

- [59] Caldwell MM, Bornman JF, Ballare CL, Flint SD, Kulandaivelu G. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobiol Sci*. 2007 Mar;6(3):252-66.
- [60] Smith RC, Prezelin BB, Baker KS, Bidigare RR, Boucher NP, Coley T, et al. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters. *Science*. 1992 Feb 21;255(5047):952-9.
- [61] Paul ND. Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. *Environ Pollut*. 2000 Jun;108(3):343-55.
- [62] Rousseaux MC, Flint SD, Searles PS, Caldwell MM. Plant responses to current solar ultraviolet-B radiation and to supplemented solar ultraviolet-B radiation simulating ozone depletion: an experimental comparison. *Photochem Photobiol*. 2004 Sep-Oct;80(2):224-30.
- [63] Rettberg P, Cockell CS. Biological UV dosimetry using the DLR-biofilm. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 Aug;3(8):781-7.
- [64] George A, Peat H, Buma A. Evaluation of DNA dosimetry to asses ozone-mediated variability of biologically harmful radiation in Antartica. . *Photochem Photobiol*. 2002;76:274-80.
- [65] Yoshida H, Regan JD. Solar UVB dosimetry by amplification of short and long segments in phage lambda DNA. *Photochem Photobiol*. 1997 Nov;66(5):672-5.
- [66] Tyrrell RM. Solar dosimetry with repair deficient bacterial spores: action spectra, photoproduct measurements and a comparison with other biological systems. *Photochem Photobiol*. 1978 May;27(5):571-9.
- [67] Munakata N, Rupert CS. Genetically controlled removal of "spore photoproduct" from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*. 1972 Jul;111(1):192-8.
- [68] Puskeppeleit M, Quintern LE, El Naggar S, Schott JU, Eschweiler U, Horneck G, et al. Long-Term Dosimetry of Solar UV Radiation in Antarctica with Spores of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*. 1992 Aug;58(8):2355-9.
- [69] Ronto G, Gaspar S, Berces A. Phage T7 in biological UV dose measurement. *J Photochem Photobiol B*. 1992 Feb 28;12(3):285-94.

Referências

- [70] Grof P, Gaspar S, Ronto G. Use of uracil thin layer for measuring biologically effective UV dose. *Photochem Photobiol.* 1996 Nov;64(5):800-6.
- [71] Berces A, Fekete A, Gaspar S, Grof P, Rettberg P, Horneck G, et al. Biological UV dosimeters in the assessment of the biological hazard from environmental radiation. *J Photochem Photobiol B.* 1999 Nov-Dec;53(1-3):36-43.
- [72] Horneck G, Rettberg P, Rabbow E, Strauch W, Seckmeyer G, Facius R, et al. Biological dosimetry of solar radiation for different simulated ozone column thicknesses. *J Photochem Photobiol B.* 1996 Feb;32(3):189-96.
- [73] Agnez-Lima LF, Di Mascio P, Napolitano RL, Fuchs RP, Menck CF. Mutation spectrum induced by singlet oxygen in *Escherichia coli* deficient in exonuclease III. *Photochem Photobiol.* 1999 Oct;70(4):505-11.
- [74] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989:1.42-1.6.
- [75] Ribeiro DT, Madzak C, Sarasin A, Di Mascio P, Sies H, Menck CF. Singlet oxygen induced DNA damage and mutagenicity in a single-stranded SV40-based shuttle vector. *Photochem Photobiol.* 1992 Jan;55(1):39-45.
- [76] Higurashi M, Ohtsuki T, Inase A, Kusumoto R, Masutani C, Hanaoka F, et al. Identification and characterization of an intermediate in the alkali degradation of (6-4) photoproduct-containing DNA. *J Biol Chem.* 2003 Dec 19;278(51):51968-73.
- [77] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6640-5.
- [78] Ariza RR, Roldan-Arjona T, Hera C, Pueyo C. A method for selection of forward mutations in supF gene carried by shuttle-vector plasmids. *Carcinogenesis.* 1993 Feb;14(2):303-5.
- [79] Aertsen A, Michiels CW. Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2005 Dec;58(5):1381-91.
- [80] Tyrrell RM. Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation. *Photochem Photobiol.* 1973 Jan;17(1):69-73.
- [81] Kielbassa C, Roza L, Epe B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis.* 1997 Apr;18(4):811-6.

Referências

- [82] Kanno S, Iwai S, Takao M, Yasui A. Repair of apurinic/apyrimidinic sites by UV damage endonuclease; a repair protein for UV and oxidative damage. *Nucleic Acids Res.* 1999 Aug 1;27(15):3096-103.
- [83] Zhao Y, Goriparthi L, Lieberman HB. A new shuttle vector system for the identification of spontaneous and radiation-induced mutations in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat Res.* 1994 Nov 1;311(1):111-23.
- [84] King NM, Oakley GG, Medvedovic M, Dixon K. XPA protein alters the specificity of ultraviolet light-induced mutagenesis in vitro. *Environ Mol Mutagen.* 2001;37(4):329-39.
- [85] Canella KA, Seidman MM. Mutation spectra in supF: approaches to elucidating sequence context effects. *Mutat Res.* 2000 May 30;450(1-2):61-73.

Anexos - Artigos

1. Schuch AP, da Silva Galhardo R, de Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CF. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2009 Jan;8(1):111-20.
2. Schuch AP, Menck CF. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. Submetido ao *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009.

Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation

André Passaglia Schuch,^a Rodrigo da Silva Galhardo,^a Keronninn Moreno de Lima-Bessa,^a Nelson Jorge Schuch^b and Carlos Frederico Martins Menck^{*a}

Received 16th June 2008, Accepted 13th October 2008

First published as an Advance Article on the web 20th November 2008

DOI: 10.1039/b810085c

Solar radiation sustains and affects all life forms on Earth. In recent years, the increase in environmental levels of solar-UV radiation due to depletion of the stratospheric ozone layer, as a result of anthropogenic emission of destructive chemicals, has highlighted serious issues of social concern. This becomes still more dramatic in tropical and subtropical regions, where the intensity of solar radiation is higher. To better understand the impact of the harmful effects of solar-UV radiation on the DNA molecule, we developed a reliable biological monitoring system based on the exposure of plasmid DNA to artificial UV lamps and sunlight. The determination and quantification of different types of UV photoproducts were performed through the use of specific DNA repair enzymes and antibodies. As expected, a significant number of CPDs and 6-4PPs was observed when the DNA-dosimeter system was exposed to increasing doses of UVB radiation. Moreover, CPDs could also be clearly detected in plasmid DNA when this system was exposed to either UVA or directly to sunlight. Interestingly, although less abundant, 6-4PPs and oxidative DNA damage were also generated after exposure to both UVA and sunlight. These results confirm the genotoxic potential of sunlight, reveal that UVA may also produce CPDs and 6-4PPs directly in naked DNA and demonstrate the applicability of a DNA-dosimeter system for monitoring the biological effects of solar-UV radiation.

Introduction

On a global scale, besides CO₂ accumulation other environmental variables such as temperature and UV radiation are increasing by various degrees at different latitudes.¹ The increase in environmental levels of solar-UV radiation observed over the last decades has been addressed to depletion of the stratospheric ozone layer as a result of anthropogenic emission of destructive chemicals into the atmosphere.²

The proportion of total UV radiation currently reaching the Earth's surface is only 6.1% of the solar electromagnetic spectrum. Most of this corresponds to UVA radiation (320 to 400 nm), which comprises 5.6% of the solar spectrum, and reaches the ground without significant absorption by the atmosphere. UVB radiation (280 to 320 nm) constitutes about 0.5% of the solar spectrum, even though ozone layer depletion can cause changes in its spectral distribution. Ozone and oxygen completely absorb UVC radiation (<280 nm), thus these wavelengths do not reach the Earth's surface.^{3,4} Although UV radiation represents only a small part of the solar spectrum, it has enormous importance on the structure of the atmosphere, as well as a critical impact on the biosphere.⁵ Its main biological relevance is due to its capacity to induce DNA damage in different aquatic and terrestrial life forms.⁶

The chemical nature and efficiency in the formation of DNA lesions greatly depend on the wavelength of the incident photons. A striking biological observation is that DNA strongly absorbs UV light with an absorption spectrum paralleling that of ozone, thus providing a perfect umbrella to shield DNA from the damages of solar-UV radiation.^{3,7}

Photocarcinogenesis is most commonly thought to be the result of a chain of events that involve induction of DNA damage and subsequent mutation formation following exposure to UV light.⁸ Bipyrimidine photoproducts, including *Cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts (6-4PPs), are the main lesions induced by UVB radiation, and support for the involvement of these lesions in photo-carcinogenesis being provided by the overwhelming proportion of mutations detected at bipyrimidine sites in human skin-tumors.^{9,10} CPDs are formed between bonds 5 and 6 of two adjacent pyrimidine bases, whereas 6-4PPs are characterized by a stable bond between positions 6 and 4 of two neighboring pyrimidines. The energy of these short-wavelength UVB photons is high enough to generate the formation of CPDs or 6-4PPs through direct absorption by DNA.^{4,11–13}

The absorption of DNA is rather weak in the less energetic, long-wavelength UV range, and it is evident that UVA radiation is far less efficient in producing direct photo-lesions.⁴ Oxidized bases have been shown to be induced in a naked DNA solution and in cells by UVA radiation.¹⁴ On the other hand, recent research employing cultured cells challenges the hypothesis that UVA-induced DNA damage is mostly mediated by oxidative stress, showing that CPDs are more efficiently generated by UVA and are more biologically relevant than oxidatively induced DNA

^aDepartment of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. E-mail: cfmmenck@usp.br; Fax: 55.11.3091-7354; Tel: 55.11.3091-7499

^bSouthern Regional Space Research Center, CRSPE/INPE-MCT, Santa Maria, RS, Brazil

lesions.^{15,16} These results confirm previous observations by Tyrrell *et al.*,¹⁷ who found that UVA produces CPDs in naked and phage DNA.

Although the induction of 6-4PPs by UVA has been reported as undetectable,^{13,15,16,18} wavelengths close to 320 nm are capable of inducing its photo-isomerization into Dewar isomers.^{10,16,19} It has been demonstrated that Dewar photoproducts (DewarPP, a valence isomer of 6-4PP) are removed from the genome of mammalian cells with kinetics and efficiency similar to those of CPD, a similarity of response thereby suggesting that this type of DNA photoproduct may also contribute significantly to the mutagenesis that occurs after exposure to sunlight.¹⁹

In an attempt to evaluate the biological effects of solar-UV radiation, efforts are being made worldwide to develop dosimetric systems through the use of biological material.^{6,20,21} Since DNA is the main UV target in living organisms, it is quite natural to employ DNA as a molecular dosimeter for the detection of damage. In fact, a UVB DNA dosimeter was developed based on minidots of dried bacteriophage λ DNA placed on a UV-transparent polymer film. The photoinduced DNA damages block synthesis during polymerase chain reactions (PCR) reducing the amount of amplified product of UV-exposed DNA compared to the control DNA.²² The possibility to evaluate the integration of DNA-absorbed solar energy was considered through the irradiation of populations of radiation sensitive spores (*B. subtilis* UVSSP), vegetative bacteria (*E. coli* K12-AB2480) and bacteriophage (*E. coli* phage T4vx) with monochromatic far- and near-UV and sunlight.²³ Four DNA-based biological dosimeters (*B. subtilis* spores,^{6,24} DLR-biofilm developed specifically from *B. subtilis* spore,²⁵ bacteriophage T7²⁶ and polycrystalline uracil thin layer²⁷) were also evaluated in laboratory and field measurements for their biological effectiveness as UV detector.²⁸ It has been demonstrated that these types of dosimeters can be employed in different field applications, including the measurement of extraterrestrial solar radiation.²⁹

In this work, we describe the development of a versatile and reliable system with the aim of evaluating the effects of direct solar-UV radiation on DNA. The DNA-dosimeter system is based on the exposure of a plasmid DNA solution to each UV

region of the terrestrial solar spectrum (UVB and UVA) and also directly to sunlight. In order to discriminate the different types of DNA photolesions after exposure to UV lamps and sunlight, the *E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg – recognizes mainly oxidative damages in purines), the T4 bacteriophage endonuclease V (T4-endo V – recognizes mainly CPDs), and the yeast DNA repair enzyme Ultraviolet Damage Endonuclease (UVDE – recognizes mainly large distortions in DNA double helix like CPDs, 6-4PPs, as well as DewarPPs), were employed. Apurinic/apyrimidinic (AP) sites and 6-4PPs were also identified by alkali treatment of the irradiated DNA. Moreover, specific antibodies were used in immunoblot assays to confirm the induction of CPDs and 6-4PPs after UV exposure. We were able to demonstrate the biological relevance of this DNA-dosimeter through the quantification of oxidative DNA damage, CPDs, 6-4PPs and other distorting lesions, possibly DewarPPs, in plasmid DNA samples exposed to solar radiation. The ratio of the different types of lesions was also described for each specific radiation condition, the data indicating that, as expected, sunlight induces lesions that resemble UVB, in addition to oxidative DNA damages.

Materials and methods

Plasmid

The *E. coli* strain *DH10b* was made electro-competent³⁰ and transformed with *pCMUT* vector (1762 bp) (*C* – chloramphenicol resistance, and *MUT* – *supF* mutation target gene). The plasmid was derived from *pAC189* plasmid³¹ as described in Fig. 1. Purification of DNA samples was prepared by using Qiagen maxi kits (Valencia, USA), and stored in TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA).

UV sources and irradiation of the DNA-dosimeter system

UVB radiation was carried out with a Vilber Loumart T15M 15 W lamp and, in this case, the DNA-dosimeter system was covered with a polycarbonate sheet to filter UVC wavelengths. For UVA radiation, samples in the DNA-dosimeter system were irradiated by an Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W lamp filtered with a

Fig. 1 Scheme for the genetic map of the plasmid *pCMUT*. This plasmid was obtained through *EcoRI* digestion of *pAC189*. The main sites are indicated and the plasmids are not in scale.

Schott BG39 glass filter 3 mm thickness (Schott Glass, Germany). The dose rates of UVB and UVA lamps were measured with a UV radiometer VLX 3 W (Vilber Lourmat, Torcy, France), whereby values obtained were $4.8 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and $87 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectively. The irradiance spectra for the two lamps with and without filter, according to Gróf *et al.*,³² are presented in Fig. 2. The amount of UVC contamination for UVB light, as well as, UVC and UVB for UVA was below detection limits.

Fig. 2 Irradiance spectra of UVB and UVA lamps. **A.** Irradiance spectra of a Vilber Lourmat T15M 15 W UVB lamp filtered with a polycarbonate sheet. **B.** Irradiance spectra of an Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W lamp filtered with a Schott BG39 glass filter 3 mm thickness (Schott Glass, Germany). These spectra were obtained by using an Ocean Optics 1560 Spectroradiometer HR4000. The environmental temperature and relative air humidity were measured by a Visomes LV12168/06 Thermohygrometer, varying between 21 °C–22 °C and 60%–70%, respectively.

Sunlight exposures were performed on a platform placed at the Southern Space Observatory (SSO), São Martinho da Serra, located in the central region of the southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul (Southern region of Brazil, 29.44 °S, 53.8 °W) in parallel to radiometric photometry observations in December 2006 (27th and 29th) and January 2007 (4th). On each day, exposures of the DNA-dosimeter system were performed for 4 continuous hours from 10:00 am to 2:00 pm together with unexposed controls (the samples were covered with aluminum foils). The UVB and UVA doses were obtained from integrations of irradiance values measured by continuous UVB and UVA meters (UVB and UVA Radiometers, EKO Instruments Trading Co., Ltd., Japan) installed at SSO.

DNA photoproducts quantification

To determine the average number of DNA photoproducts generated by UV lamps and sunlight, the relative amounts of supercoiled (FI) and circle (FII) plasmid DNA forms were measured after

separation by 0.8% agarose gel electrophoresis through densitometry analyses (Image Quant 300, GE Healthcare, USA). Samples with 200 ng of DNA were pre-incubated with 0.8 U of *E. coli* Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg protein, from New England Biolabs, Ipswich, USA), 70 ng of T4 bacteriophage endonuclease V (T4-endo V, produced in this laboratory) and 250 ng of yeast DNA repair enzyme Ultraviolet Damage Endonuclease (UVDE, from Trevigen, Gaithersburg, USA), to discriminate the different types of DNA lesions. These samples were incubated at 37 °C (for Fpg and T4-endo V) and 30 °C (for UVDE) for 30 min. T4-endo V and Fpg buffers and incubation conditions were previously described.⁴ UVDE application was performed according to manufacturer's instructions. The enzymes were tested up to saturation, and were used in amounts where no specific cleavage is observed.

The number of enzyme sensitive sites per Kbp of plasmid DNA was calculated, assuming a Poisson distribution adapted to this technique, by the following equation:

$$X = -\ln(1.4 \times FI / 1.4 \times FI + FII) / 1.8$$

where FI represents the intensity of fluorescence measured in the supercoiled DNA bands, FII the intensity in the relaxed DNA bands, 1.4 is a factor employed for correcting the increased fluorescence of ethidium bromide when bound to the relaxed form compared to the supercoiled form, and 1.8 is *pCMUT* vector size in Kbp.³³

Immunoblot assays

Plasmid DNA samples obtained after each exposure were boiled for 10 min and then spotted onto a nitrocellulose membrane (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) by using a slot-blot apparatus. The membrane was subsequently incubated with 5 X SSC (750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate) for 15 min at 37 °C, dried at room temperature and then baked for 2 hours at 80 °C. Blocking was performed in 5% milk for 18 h, whereupon the membrane was incubated with the respective primary antibodies (MBL International Corporation, Nakaku Nagoya, Japan) for immunodetection of CPDs and 6-4PPs. Anti-mouse IgG HRP conjugate (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used as a secondary antibody. Blots were developed by using a chemiluminescence detection system (Image Quant 300, GE Healthcare).

Identification of AP sites and 6-4 photoproducts through alkali treatment

The direct quantification of AP sites and 6-4PPs was also performed by an adaptation of the technique described by Higurashi *et al.*³⁴ Plasmid DNA samples exposed to UVA light were dissolved in 50 mM of sodium phosphate (pH 12.0), and the mixtures were incubated at 60 °C for 30 min (mild treatment) to detect AP sites and 4 h for 6-4PPs. After neutralization with HCl 0.1 M, the relative amounts of supercoiled (FI) and circle (FII) plasmid DNA forms (200 ng) were measured after separation by 0.8% agarose gel electrophoresis through densitometry analyses (Image Quant 300, GE Healthcare), and the number of lesions per Kbp calculated as described above.

Results

Development of the DNA-dosimeter system

To develop a reliable system for the exposure of DNA samples to sunlight, we searched for material that would present the most adequate features: (i) high transmittance to UVB and UVA wavelengths; (ii) resistance to environmental adversities, thereby avoiding tanning; (iii) the possibility of framing the shape of the template according to the aim of the experiment; and (iv) low costs. We chose the Elastomer Sylgard 184TM Kit (Dow Corning Corporation, USA) for constructing the DNA-dosimeter system, since it was the one which best fits these requirements. Both the DNA-dosimeter system developed to perform exposures to sunlight, as well as its transmittance spectrum, are shown in Fig. 3. As indicated in Fig. 3A, DNA samples were applied in triplicate in the DNA-dosimeter system for performing the desired exposures. For unexposed samples, the DNA-dosimeter system was covered with an aluminum foil and submitted to the same conditions as those exposed to sunlight. As shown in Fig. 3B, this elastomer provides high transmittance for wavelengths above 240 nm.

Fig. 3 The DNA-dosimeter system. **A.** The DNA-dosimeter system was developed by employing the Kit Elastomer Sylgard 184TM. This system was used for exposures of DNA samples to sunlight, as indicated by arrows. Control samples were covered with an aluminum foil. **B.** Transmittance spectrum of the Kit Elastomer Sylgard 184TM.

Quantification of DNA lesions induced by UVB and UVA radiation

Initially, the generation of plasmid DNA damage was defined after exposure to artificial UV sources. Plasmid DNA samples were irradiated by UVB or UVA lamps, and then treated with Fpg, T4-endo V and UVDE DNA repair enzymes to quantify specific DNA lesions induced by each UV band. Samples were analyzed

by electrophoresis migration in agarose gels to discriminate supercoiled DNA (form I) from open-circle relaxed DNA presenting breaks or nicks caused by enzymatic cleavage (form II). Fig. 4 illustrates one of these experiments. A summary of the results is presented in Fig. 5.

Fig. 4 Representative example of DNA photolesions determination after the DNA exposure in the DNA-dosimeter system to UVB (**A**) and UVA radiation (**B**). Plasmid DNA samples were exposed to increasing doses of UVB and UVA radiation and then treated with Fpg, T4-endo V, and UVDE enzymes; **no** indicates similar treatment with no enzyme. FI indicates the supercoiled DNA form and FII the relaxed DNA form.

Fig. 5 Induction of DNA photoproducts after exposures to UVB (**A**) and UVA (**B**) lamps. The results represent the average and standard deviation of three independent experiments for each condition of exposure. SSB – single strand breaks; Fpg-SS – Fpg sensitive sites; T4-endo V-SS – T4-endo V sensitive sites; UVDE-SS – UVDE sensitive sites.

There was a dose-dependent increase of circle-relaxed DNA (form II), when UVB or UVA-irradiated DNA samples were

Table 1 Measurements of UVA and UVB-solar radiation, and the average temperature during the exposure periods at the Southern Space Observatory – SSO, from the Southern Regional Space Center, National Institute for Space Research – INPE/MCT

Sunlight exposures SSO Brazil	SSO 10:00 am–14:00 pm UVA KJ m ⁻² 315–400 nm	SSO 10:00 am–14:00 pm UVB KJ m ⁻² 280–315 nm	Average Temperature °C
12/27/2006	191.1	5.2	22.6
12/29/2006	176.7	4.8	25.9
01/04/2007	81.4	2.3	24.2

incubated with the respective DNA repair enzymes, as clearly shown in Fig. 4. In addition, as shown in Fig. 5, the increase in the frequency of DNA lesions was linear according to the UV dose employed. Few or no direct breaks (single-strand breaks – SSBs) were detected for any of the types of radiation and doses performed. As expected, the induction of Fpg-sensitive sites (Fpg-SS – oxidative DNA damage) were significantly higher (compared to the other photoproducts) after UVA, in relation to UVB radiation. T4-endo V-sensitive sites (T4-endo V-SS) were highly induced by UVB, but the higher number of UVDE-sensitive sites (UVDE-SS) was most probably due to the formation of 6-4PPs besides CPDs. In addition, although at a lower frequency when compared to UVB, T4-endo V-SSs were also detected after UVA radiation. Surprisingly, the induction of UVDE-SS was more frequent than T4-endo V-SS, thereby indicating the presence of other distorting lesions in addition to CPDs in these DNA samples, possibly 6-4PPs and/or DewarPPs.

Quantification of DNA lesions induced by sunlight

Environmental exposures using the DNA-dosimeter system were carried out on a platform situated at the Southern Space Observatory (SSO). Exposures were performed during two cloudless (December 27th and 29th, 2006), and one cloudy (January 4th, 2007) days, for four continuous hours, from 10:00 am to 2:00 pm. In parallel, solar UVB and UVA radiations were measured by solar-UV radiometers. UV radiation doses and the average temperature during exposure periods are presented in Table 1. The induction of DNA photoproducts direct by sunlight was measured as described above, and the data are shown in Fig. 6.

Fig. 6 Induction of DNA lesions after exposures to sunlight at SSO using the DNA-dosimeter system. The results represent the average and standard deviation of experiments performed in triplicate for each day of exposure. Control samples were also exposed, but the DNA-dosimeter system was covered with aluminum foil. SSB- single strand breaks; Fpg-SS – Fpg sensitive sites; T4-endo V-SS – T4-endo V sensitive sites; UVDE-SS – UVDE sensitive sites.

Table 2 Relative ratio of DNA damage produced after exposure to UVB, UVA and sunlight

UVB Doses/KJ m ⁻²	T4-endo V-SS/Fpg-SS	T4-endo V-SS/UVDE- SS–T4-endo V-SS
2	12.1	3.2
4	8.7	2.3
6	6.8	2.8
UVA Doses/KJ m ⁻²		
100	2.5	4.0
200	2.1	3.6
300	2.0	3.0
Sunlight exposures		
2006/12/27	1.2	3.1
2006/12/29	1.3	2.9
2007/01/04	1.3	3.1

Although the frequency of DNA photoproducts varied according to radiation dose received daily (Table 1), the relative proportion of the types of DNA lesions was basically similar for the three days. The frequency of observed direct breaks (SSBs) was very low, although significantly higher for DNA exposed 12/27/2006.

A direct correlation between UVB and UVA doses measured during sunlight exposures (Table 1) with irradiation performed in the laboratory is difficult, as the dosimeters employed were different, and solar-UV represents in fact a combination of light irradiation, with a different incident spectrum when compared to those emitted by artificial lamps. However, it is interesting to note that for the same intensity, the frequency of T4-endo V-SS produced after sunlight exposure was lower than that observed for independent UVB and UVA radiation.

Different from what was observed after irradiation with artificial lamps, after exposure to sunlight, Fpg-SS levels were higher and very close to those of T4-endo V-SS. In fact, the ratio of T4-endo V-SS/Fpg-SS was close to 1.2 after sunlight, when compared to 2.2 after UVA and 9.2 after UVB radiation (Table 2).

Interestingly, a further increase was observed for UVDE-SS, probably due to the induction of CPDs, 6-4PPs and DewarPPs in plasmid DNA samples exposed to sunlight. Considering that T4-endonuclease V recognizes mainly CPDs and that the extra DNA lesions recognized as UVDE-SS are composed of 6-4PPs and DewarPPs, we also calculated the ratio of CPDs/(6-4PPs + DewarPPs) (T4-endo V-SS/UVDE-SS – T4-endo V-SS), in order to compare the different types of irradiation. The data are presented in Table 2. While CPDs were the most frequent DNA photoproducts observed following UVB, UVA and sunlight, the ratio of CPDs/(6-4PPs + DewarPPs) was slightly higher for UVA (3.0 to 4.0), when compared to UVB (2.3 to 3.2) or sunlight exposures (2.9 to 3.1).

Fig. 7 Immunoblot assay with plasmid DNA samples exposed to UVB and UVA radiation. **A.** Detection through the use of antibodies anti-CPD and anti-6-4PP. **B.** Quantification of CPD induction relative to DNA control samples (fold increase in relation to non-exposed control samples – no UV). **C.** Quantification of 6-4PP induction relative to DNA control samples (fold increase in relation to non-exposed control samples – no UV).

Detection of DNA photoproducts through immunoblot assays

Immunoblot assays using specific antibodies were carried out with the purpose of confirming and comparing the efficiency of induction of CPDs and 6-4PPs, after exposure of DNA samples to UVB, UVA, and sunlight radiation. The induction of these photoproducts by artificial light is shown in Fig. 7.

As expected, the induction of CPDs after UVB and UVA exposures was very efficient. Confirming the data with UVDE-SS, 6-4PPs were also detected by the specific antibody when DNA samples were exposed to UVB or UVA radiation. However, contrary to what was observed for UVDE-SS and T4-endo V-SS, 6-4PPs were much less efficiently generated by UVA than by UVB.

A similar experiment was performed with the DNA samples exposed to sunlight. Results are shown in Fig. 8. As indicated by experiments with enzymes, the induction of both types of lesions (CPDs and 6-4PPs) could be observed in DNA samples exposed to sunlight.

Detection of UVA-induced AP sites and 6-4PPs by alkali treatment

The data above indicated that direct UVA radiation of plasmid DNA led to the formation of 6-4PP lesions. This was further tested using a simple hot alkali treatment, as this method was shown to identify these lesions, as well as AP sites, after mild treatment.³⁴ As shown in Fig. 9, AP sites were almost undetectable using this methodology, but a clear dose-dependent increase of 6-4PPs was observed after UVA radiation and hot alkali treatment.

Discussion

There is overwhelming evidence indicating that sunlight is a human carcinogen, and in terms of absolute numbers, is one of the most significant to which populations are exposed. Thinning of the stratospheric ozone-shield and the resulting increase in UVB

radiation reaching the Earth are expected to directly affect human health, as the incidence of all kinds of skin cancer increases with higher exposure to UVB radiation.^{12,13,16}

In order to better understand the respective contributions of each UV portion of the solar spectrum, Kuluncsics *et al.*⁴ established profiles of DNA damage induced in plasmid DNA by UVC, UVB, and UVA radiation, in comparison with the profile obtained with simulated sunlight. From that study, it was clear that UVC was more efficient in inducing CPD than UVB, whereas UVA has a very low, if any, capacity to cause this kind of DNA lesion. In comparison, simulated sunlight was 10-fold more effective in generating CPDs than UVA radiation, this reflecting the contribution of UVB wavelengths.⁴

Through the utilization of DNA repair enzymes and DNA sequencing methods, Yoon *et al.*¹⁸ observed the induction of CPDs when DNA or cells were irradiated with simulated sunlight. It was also found that 6-4PPs were formed at almost undetectable levels under conditions of irradiation for up to 5 h with a solar-UV simulator. The conclusion was that CPDs are induced at least 20 to 40 times more frequently than other DNA photoproducts after exposure to simulated sunlight.¹⁸

Using HPLC associated with tandem-mass spectrometry, Courdavault *et al.*¹⁰ studied the induction and repair of CPDs, 6-4PPs, and DewarPPs in primary cultures of human keratinocytes. They concluded that UVB radiation is capable of inducing CPDs and 6-4PPs, although no Dewar valence isomer was detected. On the other hand, UVA was found to efficiently convert 6-4PPs into their respective DewarPPs in a dose-dependent way. In addition, the induction of TT-CPDs was almost the only bipyrimidine photoproduct produced upon UVA radiation.¹⁰ Using the same methodology, Mouret *et al.*¹⁶ determined both type and yield in the formation of DNA damage throughout an entire patch of human skin when exposed to UVB or UVA radiation. The results also demonstrated that CPDs were produced in a higher yield than oxidatively generated DNA lesions, when the skin was exposed

Fig. 8 Immunoblot assay with plasmid DNA samples exposed to UVA (25 ng), UVB (25 ng), and sunlight at SSO (200 ng). **A.** CPDs and 6-4PPs detection by using anti-CPD and anti-6-4PP antibodies. **B.** Quantification of CPDs detection by using an anti-CPD antibody after exposure to sunlight (fold increase in relation to non-exposed control samples for each day). **C.** Quantification of 6-4PPs detection by using an anti-6-4PP antibody after exposure to sunlight (fold increase in relation to non-exposed control samples for each day).

Fig. 9 Detection of AP sites and 6-4PPs by alkali treatment of UVA-exposed DNA samples. **A.** Representative example of the determination of AP sites and 6-4PPs in DNA by hot alkali treatment after exposure to UVA irradiation. The conditions to discriminate between these two lesions are described in Material and Methods, adapted from previous work.³⁴ **B.** Quantification of AP sites and 6-4PPs induced after exposures to UVA light at the indicated doses and hot alkali treatment.

to UVA radiation. This recent, novel information challenges the hypothesis that UVA-induced DNA damages are mostly mediated by oxidative stress. Furthermore, no other photoproducts, such as

6-4PPs and Dewar valence isomers, could be detected in human skin exposed to UVA light.¹⁶

Through the application of an immuno-dot-blot quantification assay calibrated with DNA repair enzymes, Perdiz *et al.*¹⁹ examined the absolute amount of each type of UV photoproduct induced by UVC, UVB, UVA and simulated sunlight in plasmid DNA and genomic DNA from CHO cells. CPD induction was confirmed after all kinds of treatment, and 6-4PPs were readily produced by UVC, UVB and simulated sunlight but not by UVA. DewarPPs were also not detected after UVC and UVA exposure. On the other hand, these were relatively more frequent in cellular DNA subject to simulated sunlight exposure than UVB radiation. From these data, the authors concluded that the yield of photoproducts induced by simulated sunlight was 6 CPDs for each 6-4PP produced.¹⁹

The relative induction of CPDs and 6-4PPs (and recently DewarPPs) by solar-UV radiation and their contribution in biological process have been a matter for debate for more than 20 years. As is shown in the articles cited above, there is an enormous discrepancy among studies on the efficiency of induction of these photoproducts, when these are undertaken in an attempt to simulate environmental UV doses. In this work, we examined the induction of DNA photoproducts when subject to sunlight during three days under varying weather conditions, and then compared the results to those obtained after UVA and UVB radiation.

For this type of work, we developed a new exposure method for DNA samples with a DNA-dosimeter system (Intellectual Propriety requested), whereby all wavelengths of solar-UV radiation reach the sample with almost the original intensity. Through the use of specific DNA repair enzymes and antibodies, it was

possible to access the types of DNA lesions by using relatively small amounts of DNA samples.

After exposure of the DNA-dosimeter system to UVB and UVA, as well as directly to solar-UV radiation, we detected the induction of T4-endo V-SS in all DNA-irradiated samples, thus suggesting the formation of CPDs (Fig. 5 and 6). In agreement with several previous reports,^{4,10,13,15,16,19,35} we not only present herein evidence that CPDs are generated by UVA radiation, but also show that this is the most induced type of DNA photoproduct after UVA treatment (Fig. 5B).

Consistent with other previously published results,^{4,14,36,37} exposure to UVA radiation generated a significant amount of oxidized bases, as indicated by Fpg-SS (Fig. 5B). These Fpg-SS in plasmid DNA following UVA radiation might have been induced by an indirect mechanism through hydroxyl radicals in a Fenton reaction, due to the presence of iron bounded to DNA molecules.⁴ The UVA-DNA absorption spectra, as well as, UVA-DNA damage profile in plasmid DNA purified by CsCl gradient³⁸ was very similar than those observed with DNA samples purified with Quiagen maxi Kit (see Supplementary Data, Figure 1S), making highly unlikely the possibility that some type of photosensitizer contaminating DNA preparations could cause these photoproducts.

In order to evaluate the use of the DNA-dosimeter system to quantify DNA damage induced by direct sunlight, environmental exposures were carried out at SSO, in the South of Brazil. The results presented in Fig. 6 show that oxidative damage (Fpg-SS) was clearly induced, although CPDs (T4-endo V-SS) arose as the most abundant kind of DNA lesion after exposure to sunlight at this latitude. Curiously, the relative amount of Fpg-SS was higher after exposure to sunlight than after UVA radiation (Table 2).

Interestingly, more UVDE-SS than T4-endo V-SS were detected in all the conditions of irradiation tested. These data suggest that other distorting lesions (such as 6-4PPs) are also produced by UVB, UVA and sunlight. In order to confirm the induction of CPDs and 6-4PPs by UVA radiation and sunlight, we evaluated the occurrence of these DNA lesions by means of immunoblot assays, using antibodies specific for each kind of photoproduct. Our results clearly confirm the induction of 6-4PPs after exposure of plasmid DNA samples in the DNA-dosimeter system to UVB, UVA and sunlight (Fig. 7 and 8). Nevertheless, in the case of 6-4PPs in UVA irradiated DNA, the incidence was much lower than that detected for UVB radiation, when compared with data obtained through the use of DNA repair enzymes.

It is important to note that the two antibodies which recognize the lesions are different and the experiments are independent, thus the direct ratio of the types of DNA lesion produced (CPDs and 6-4PPs) cannot be determined by this methodology alone. In addition, the low specificity of UVDE when compared to a highly specific antibody against 6-4PP may explain the difference in the relative amount of this lesion. However, if this is the case, the results with UVDE may, in fact, be explained by the presence of a third and frequent lesion induced mainly by exposure to UVA and sunlight. Considering that the conversion of 6-4PPs to DewarPPs by UVA was previously observed,¹⁹ it is reasonable to propose that this other type of lesion is DewarPPs, also known to be a substrate for UVDE.³⁹

We also used a third methodology, hot alkali treatment, to confirm the induction of 6-4PPs by UVA light. This method

was adapted from the work of Higurashi *et al.*³⁴, who strongly suggest that this treatment results in degradation of 6-4PPs, or AP sites for mild treatment, as monitored by HPLC, NMR spectroscopy, and mass spectroscopy. Exposure of plasmid DNA to UVA light, followed by hot alkali treatment, revealed a dose-dependent increase of DNA cleavage (Fig. 9). This cleavage is most likely due to the degradation of 6-4PPs, although it should be pointed that previous work have also revealed that DewarPPs are also cleaved by hot alkali (piperidine) treatment,^{40,41} but this still needs confirmation with the alkali conditions employed in this work.

Anyway, the amount of these lesions (Fig. 9B) corresponds to approximately half of the lesions detected by UVDE enzyme, thus also pointing to the possible formation of other lesions that could be recognized by this enzyme. UVDE also cleaves DNA containing AP sites,³⁹ thus we tested this possibility in DNA exposed to UVA light. Mild alkali treatment³⁴ failed to detect any significant amount of AP sites in this DNA (Fig. 9). We further tested this DNA with the *E. coli* endonuclease IV (product of the *nfo* gene), but the results indicated that a very low, if any, AP site is induced by UVA light in our experimental conditions (Supplementary Data Figure 2S). The results with hot alkali treatment and Nfo incubation confirm the enzymatic and immunological data, giving support to the idea that UVA radiation is able to induce 6-4PPs and isomerizes it in DewarPPs concomitantly, increasing the amount of UVDE-SS in relation to T4-endo V-SS.

Discrepancies observed here and those presented in the literature may simply reflect the different methodologies applied. The techniques employed in this work are very sensitive, although they are not as specific as HPLC/MS.^{10,16} Alternatively, the differences may also be due to the manner in which samples are exposed to artificial UV lamps, in this DNA dosimeter system. In fact, when DNA samples were directly exposed to UVA light inside 30 mm polycarbonate plates, only trace amounts of 6-4PPs were detected by anti-6-4PP antibodies (data not shown). Also, induction of Fpg-SS was even higher than T4-endo V-SS after UVA treatments, this indicating an alteration in the profile of DNA damage incurred by these wavelengths (data not shown). Therefore, the use of high transmittance material such as that employed in the present work should be indicated in exposures to artificial UV lamps, since there are no guidelines giving an exact definition of the transmission curve of physical radiometers for UV measurements. Consequently, every manufacturer uses filters with different spectral curves for each UV band. Thus, measurements of a specific broad-band UV dose are not similar according to the models of both the radiometer and the lighting-source used, as well as to the material of apparatus employed to expose biological samples.

Conclusions and perspectives

One of the most important criteria for the validity of a biological dosimeter is the relevance of the photobiological/photochemical process to the biological effects. In many of the biological consequences, the key process is DNA damage due to UV radiation. Thus DNA-based biological dosimeters have genuine biological relevance.²⁸ The results obtained in this work show that the DNA-dosimeter system is efficient for indicating the amount and nature of specific DNA damage induced by sunlight.

Moreover, a comparison between the efficiency of induction of both types of photoproducts after exposure to UVB, UVA, and solar-UV radiation, reveals a considerable amount of CPDs in plasmid DNA samples exposed to UVA doses. The induction of 6-4PPs after exposure to UVA light was clear, although lower than after UVB radiation. The mechanisms involved in the generation of such lesions by UVA light (CPDs and 6-4PPs) and in oxidative DNA damage, are unknown, as DNA was irradiated in the absence of any photosensitizer and no UVB trace was detected with the filters used (Fig. 2). This question remains open and is worthy of further investigation. Nonetheless, considering environmental sunlight exposure, the DNA lesion profile obtained significantly indicated that the contribution of UVB is very high, in addition to the generation of a high frequency of oxidative DNA lesions.

Currently, we are initiating the measurement of solar UVB and UVA radiation on a parallel with an evaluation of its interaction with the DNA molecule, by exposing DNA samples to sunlight and using the DNA-dosimeter system in the city of São Paulo, Brazil. Thus, the plasmid vector employed can be transformed into bacteria, thereby providing the means of evaluating the genetic effects of sunlight. In fact, shortly the biological effects of sunlight will be evaluated through an analysis of the DNA inactivation rate, mutagenesis frequency and the mutation spectra of the *supF* gene of *pCMUT* plasmid, after replication in bacterial strains and by using simple techniques.⁴²

Therefore, we are developing a suitable system capable of fulfilling the basic concept of DNA-based biological dosimetry²⁸ ((i) use of DNA-containing systems assuming them as models of DNA damage in the chromosomes; (ii) quantification of the photobiological/photochemical effect induced by UV radiation; (iii) extrapolation of the measured biological effect from a simple system of a biological dosimeter to a more complex biological effect), providing a wide comprehension of the biological effectiveness of solar-UV radiation upon the DNA molecule. Comparing the results obtained in several places world-wide at different latitudes and periods of the year may reveal important specific light influence in the living organisms.

Acknowledgements

We wish to thank Dr Marcelo Barcellos da Rosa and Pabulo Henrique Rampelotto for assistance during the environmental exposures at SSO. This work was supported by FAPESP (São Paulo, Brazil) and CNPq (Brasília, Brazil).

References

- 1 M. M. Caldwell, J. F. Bornman, C. L. Ballare, S. D. Flint and G. Kulandaivelu, Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 252–266.
- 2 M. Norval, A. P. Cullen, F. R. de Gruijl, J. Longstreth, Y. Takizawa, R. M. Lucas, F. P. Noonan and J. C. van der Leun, The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 232–251.
- 3 A. Takahashi and T. Ohnishi, The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station, *Biol. Sci. Space*, 2004, **18**, 255–260.
- 4 Z. Kuluncsics, D. Perdiz, E. Brulay, B. Muel and E. Sage, Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1999, **49**, 71–80.
- 5 J. E. Frederick and D. Lubin, *Solar ultraviolet irradiance at Palmer Station, Antarctica. Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*, 1994.
- 6 N. Munakata, S. Cornain, M. Kanoko, K. Mulyadi, S. Lestari, W. Wirohadidjojo, D. Bolsee, S. Kazadzis, V. Meyer-Rochow, N. Schuch, C. Casaccia, M. Kaneko, C. M. Liu, K. Jimbow, T. Saida, C. Nishigori, K. Ogata, K. Inafuku, K. Hieda and M. Ichihashi, 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.
- 7 J. Rozema, P. Boelen and P. Blokker, Depletion of stratospheric ozone over the Antarctic and Arctic: Responses of plants of polar terrestrial ecosystems to enhanced UV-B, an overview, *Environ. Poll.*, 2005, **137**, 428–442.
- 8 T. M. Rünger, How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: The role of cellular damage responses, *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, **127**, 2103–2105.
- 9 L. Daya-Grosjean and A. Sarasin, The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors, *Mutat. Res.*, 2005, **571**, 43–56.
- 10 S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet and T. Douki, Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations, *DNA Repair (Amst)*, 2005, **4**, 836–844.
- 11 S. E. Freeman, H. Hacham, R. W. Gange, D. J. Maytum, J. C. Sutherland and B. M. Sutherland, Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 5605–5609.
- 12 S. I. Tsilimigaki, N. Messini-Nikolaki, M. Kanariou and S. M. Piperakis, A study on the effects of seasonal solar radiation on exposed populations, *Mutagenesis*, 2003, **18**, 139–143.
- 13 G. P. Pfeifer, Y. H. You and A. Besaratinia, Mutations induced by ultraviolet light, *Mutat. Res.*, 2005, **571**, 19–31.
- 14 J. M. Song, J. R. Milligan and B. M. Sutherland, Bistranded oxidized purine damage clusters: induced in DNA by long-wavelength ultraviolet (290–400 nm) radiation, *Biochemistry*, 2002, **41**, 8683–8688.
- 15 T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet and E. Sage, Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation, *Biochemistry*, 2003, **42**, 9221–9226.
- 16 S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet and T. Douki, Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 13765–13770.
- 17 R. M. Tyrrell, Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation, *Photochem. Photobiol.*, 1973, **17**, 69–73.
- 18 J. H. Yoon, C. S. Lee, T. R. O'Connor, A. Yasui and G. P. Pfeifer, The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight, *J. Mol. Biol.*, 2000, **299**, 681–693.
- 19 D. Perdiz, P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi and E. Sage, 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.
- 20 P. Rettberg and C. S. Cockell, Biological UV dosimetry using the DLR-biofilm, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 781–787.
- 21 A. George, H. Peat and A. Buma, Evaluation of DNA dosimetry to assess ozone-mediated variability of biologically harmful radiation in Antarctica, *Photochem. Photobiol.*, 2002, **76**, 274–280.
- 22 H. Yoshida and J. D. Regan, Solar UVB dosimetry by amplification of short and long segments in phage lambda DNA, *Photochem. Photobiol.*, 1997, **66**, 672–675.
- 23 R. M. Tyrrell, Solar dosimetry with repair deficient bacterial spores: action spectra, photoproduct measurements and a comparison with other biological systems, *Photochem. Photobiol.*, 1978, **27**, 571–579.
- 24 N. Munakata and C. S. Rupert, Genetically controlled removal of “spore photoproduct” from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores, *J. Bacteriol.*, 1972, **111**, 192–198.
- 25 M. Puskeppel, L. E. Quinter, S. El Naggar, J. U. Schott, U. Eschweiler, G. Horneck and H. Bucker, Long-Term Dosimetry of Solar UV Radiation in Antarctica with Spores of *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**, 2355–2359.
- 26 G. Ronto, S. Gaspar and A. Berces, Phase T7 in biological UV dose measurement, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1992, **12**, 285–294.

- 27 P. Grof, S. Gaspar and G. Ronto, Use of uracil thin layer for measuring biologically effective UV dose, *Photochem. Photobiol.*, 1996, **64**, 800–806.
- 28 A. Berces, A. Fekete, S. Gaspar, P. Grof, P. Rettberg, G. Horneck and G. Ronto, Biological UV dosimeters in the assessment of the biological hazard from environmental radiation, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1999, **53**, 36–43.
- 29 G. Horneck, P. Rettberg, E. Rabbow, W. Strauch, G. Seckmeyer, R. Facius, G. Reitz, K. Strauch and J. U. Schott, Biological dosimetry of solar radiation for different simulated ozone column thicknesses, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1996, **32**, 189–196.
- 30 K. A. Datsenko and B. L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 6640–6645.
- 31 L. F. Agnez-Lima, P. Di Mascio, R. L. Napolitano, R. P. Fuchs and C. F. Menck, Mutation spectrum induced by singlet oxygen in *Escherichia coli* deficient in exonuclease III, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **70**, 505–511.
- 32 P. Grof, G. Ronto and E. Sage, A computational study of physical and biological characterization of common UV sources and filters, and their relevance for substituting sunlight, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2002, **68**, 53–59.
- 33 P. Di Mascio, H. Wefers, H. P. Do-Thi, M. V. Lafleur and H. Sies, Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strand breaks, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **1007**, 151–157.
- 34 M. Higurashi, T. Ohtsuki, A. Inase, R. Kusumoto, C. Masutani, F. Hanaoka and S. Iwai, Identification and characterization of an intermediate in the alkali degradation of (6-4) photoproduct-containing DNA, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 51968–51973.
- 35 R. M. Tyrrell, R. D. Ley and R. B. Webb, Induction of single-strand breaks (alkali-labile bonds) in bacterial and phage DNA by near UV (365 nm) radiation, *Photochem. Photobiol.*, 1974, **20**, 395–398.
- 36 J. Cadet, E. Sage and T. Douki, Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA, *Mutat. Res.*, 2005, **571**, 3–17.
- 37 C. Kielbassa, L. Roza and B. Epe, Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light, *Carcinogenesis*, 1997, **18**, 811–816.
- 38 J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd edn., 1989, vol. 1, ch. 1, pp. 1.42–41.46.
- 39 S. Kanno, S. Iwai, M. Takao and A. Yasui, Repair of apurinic/aprimidinic sites by UV damage endonuclease; a repair protein for UV and oxidative damage, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 3096–3103.
- 40 L. S. Kan, L. Voituriez and J. Cadet, The Dewar valence isomer of the (6-4) photoadduct of thymidyl(3'-5')-thymidine monophosphate: formation, alkaline lability and conformational properties, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1992, **12**, 339–357.
- 41 C. A. Smith and J. S. Taylor, Preparation and characterization of a set of deoxyoligonucleotide 49-mers containing site-specific cis-syn, trans-syn-I, (6-4), and Dewar photoproducts of thymidyl(3'→5')-thymidine, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 11143–11151.
- 42 R. R. Ariza, T. Roldan-Arjona, C. Hera and C. Pueyo, A method for selection of forward mutations in supF gene carried by shuttle-vector plasmids, *Carcinogenesis*, 1993, **14**, 303–305.

Manuscript Number:

Title: THE GENOTOXIC EFFECTS OF DNA LESIONS INDUCED BY ARTIFICIAL UV-RADIATION AND
SUNLIGHT

Article Type: Full Length Article

Keywords: ultraviolet radiation; supF gene; DNA damage; DNA inactivation; mutagenesis.

Corresponding Author: Dr. Carlos Frederico Martins Menck, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of São Paulo

First Author: André P Schuch, Ph.D. student

Order of Authors: André P Schuch, Ph.D. student; Carlos Frederico Martins Menck, Ph.D.

Suggested Reviewers: Rex M Tyrrell Ph.D.
Department of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath
R.M.Tyrrell@bath.ac.uk

Ben Van Houten Ph.D.
Laboratory of Molecular Genetics, National Institute of Environmental and Health, National Institutes
of Health
vanhout1@niehs.nih.gov

Philip C. Hanawalt Ph.D.
Department of Biological Sciences, Stanford University
hanawalt@stanford.edu

Evelyne Sage Ph.D.
Institut Curie
evelyne.sage@curie.u-psud.fr

G.T. van der Horst Ph.D.
Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University Medical Center
g.vanderhorst@erasmusmc.nl

Journal name: JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY

Manuscript title: THE GENOTOXIC EFFECTS OF DNA LESIONS INDUCED BY ARTIFICIAL UV-RADIATION AND SUNLIGHT

Dear Editor,

Thank you for your useful comments and suggestions on the language and structure of our manuscript. We have modified the manuscript accordingly, and detailed corrections are listed below point by point:

- 1) Keywords should be provided after the abstract.
✓ The keywords have been provided after the abstract.

The manuscript has been resubmitted to your journal. We look forward to your positive response.

André Passaglia Schuch & Carlos Frederico Martins Menck.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária
05508 São Paulo
Fax: 55 11 3091-7354
Fone: 55 11 3091-7499

São Paulo, October 28th, 2009.

Dr. Robert Carpentier
Dept. de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois Rivières, 3351
Boulevard des Forges, C.P. 500
Quebec, G9A 5H7
Canada

Dear Dr. Carpentier,

Please find enclosed a copy of our manuscript entitled: "THE GENOTOXIC EFFECTS OF DNA LESIONS INDUCED BY ARTIFICIAL UV-RADIATION AND SUNLIGHT", which we submit for your evaluation for publication in JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY. In this work, we describe the evaluation of DNA damage and genotoxic effects after exposure of plasmid DNA samples to UVC, UVB, UVA, or directly to solar radiation. The determination and quantification of different types of UV photoproducts were performed through the use of specific DNA repair enzymes, and CPDs and oxidative lesions were detected by these assays. On the other hand, the biological effects of such lesions were determined through the analysis of the plasmid inactivation rate and mutation frequency, after transfection in an *Escherichia coli* MBL50 strain. The results basically confirm the genotoxic potential of sunlight, and indicate that CPD photoproducts, and not the oxidative damages, are the lesions that better correlate to plasmid inactivation as well as mutation induction.

The content of the manuscript is original and it has not been published or accepted for publication elsewhere. No part of this manuscript is currently under consideration for publication elsewhere.

I hope this manuscript can fit for publication in JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY, and if you have any further questions, please do not hesitate in contact me.

Sincerely yours,

Dr. Carlos Frederico Martins Menck
Depto. de Microbiologia, ICB, USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374.
Ed. Biomédicas 2, São Paulo, 05508-900, SP,
tel. 55.11.3091.7499; fax# 55.11.3091.7354

Suggestions of potential reviewers for this manuscript.

Dr. Rex M. Tyrrell
Department of Pharmacy and Pharmacology,
University of Bath,
Bath, BA2 7AY U.K., 924.
Email: R.M.Tyrrell@bath.ac.uk

Dr. Ben Van Houten
Laboratory of Molecular Genetics, National Institute of Environmental and Health
Sciences, National Institutes of Health, 111 Alexander Drive, P.O. Box 12233, Research
Triangle Park, NC 27709, USA
Email: vanhout1@niehs.nih.gov

Dr. Philip C. Hanawalt
Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford CA 94305-5020, USA.
E-mail: hanawalt@stanford.edu

Dr. Evelyne Sage
Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche
2027, Bâtiment 110, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France;
Email: evelyne.sage@curie.u-psud.fr

Dr. G.T. van der Horst
Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam,
The Netherlands
Email: g.vanderhorst@erasmusmc.nl

**THE GENOTOXIC EFFECTS OF DNA LESIONS INDUCED BY
ARTIFICIAL UV-RADIATION AND SUNLIGHT**

André Passaglia Schuch^a & Carlos Frederico Martins Menck^{a*}.

^aDepartment of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

André Passaglia Schuch: aschuch@usp.br

***Corresponding author:**

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.

Fax: 55.11.3091-7354; Tel.: 55.11.3091-7499, e-mail: cfmmenck@usp.br

Running title: Genotoxicity of UV and sunlight.

ABSTRACT

Solar radiation sustains and affects all life forms on Earth. The increase in solar UV-radiation at environmental levels, due to depletion of the stratospheric ozone layer, highlights serious issues of social concern. This becomes still more dramatic in tropical and subtropical regions where radiation-intensity is still higher. Thus, there is the need to evaluate the harmful effects of solar-UV radiation on the DNA molecule as a basis for assessing the risks involved for human health, biological productivity and ecosystems. In order to evaluate the profile of DNA damage induced by this form of radiation and its genotoxic effects, plasmid DNA samples were exposed to artificial UV lamps and directly to sunlight. The induction of cyclobutane pyrimidine dimer photoproducts (CPDs) and oxidative DNA damage in these molecules were evaluated by means of specific DNA repair enzymes. On the other hand, the biological effects of such lesions were determined through the analysis of the DNA inactivation rate and mutation frequency, after replication of the damaged *pCMUT* vector in an *Escherichia coli* *MBL50* strain. The results indicated the induction of a significant number of CPDs after exposure to increasing doses of UVC, UVB, UVA radiation and sunlight. Nevertheless, CPD photoproducts are those lesions that better correlate to plasmid inactivation as well as mutagenesis. Oxidative DNA damage does not correlate with these effects. The results indicated that DNA photoproducts play the main role in the induction of genotoxic effects by artificial UV radiation sources and sunlight.

Keywords: ultraviolet radiation; *supF* gene; DNA damage; DNA inactivation; mutagenesis.

1. INTRODUCTION

Ultraviolet (UV) radiation generates mainly pyrimidine dimer lesions in genomic DNA. In both prokaryotes and eukaryotes, these UV-induced DNA lesions are removed by nucleotide excision repair, but if not, they can interfere with basic cellular processes such as transcription and DNA replication, and can lead to mutations and cell death. Most of the mutagenic and carcinogenic properties of sunlight have long been attributed to the short-wavelength range (UVB; 280-315 nm) of the solar UV spectrum, although long-wavelength UV light (UVA; 315-400 nm) can also damage DNA, by presenting mutagenic and carcinogenic properties [1]. However, the relevance of UVA effects for solar mutagenesis and the mechanisms by which it induces mutations remain a matter for debate [2].

The maximum of light absorption by DNA molecules is 260 nm, whereby UVC (100-280 nm) is revealed as the most effective wavelength for the induction of DNA photoproducts. However, ozone and oxygen completely absorb UVC radiation (<280 nm), thereby preventing these wavelengths from reaching the Earth's surface [3]. Different wavelengths of UV light induce different types of DNA damage. Through direct excitation of the DNA molecule, UVB radiation generates DNA photoproducts, mostly cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PPs). These photoproducts generate typical mutations, namely C – T transitions, by misincorporation of the adenine opposite to cytosine during replication. These transitions, including CC – TT tandem mutations, have been termed UV-signature mutations [4]. They are in fact signature mutations for pyrimidine dimers, and it is generally accepted that pyrimidine dimers are the major pre-mutagenic lesions from UVB. Upon further irradiation with UV wavelengths of around 320 nm, the normal

isomers of 6-4PP can be converted to their Dewar valence isomers, which are probably less mutagenic but may still contribute to solar mutagenesis [5].

UV-induced DNA photoproducts are a result of the direct absorption of photons by DNA bases. However, UV-radiation can also damage DNA indirectly [6]. After the absorption of photons by chromophores other than DNA, energy can be transferred to molecular oxygen, thereby generating a reactive oxygen species which in turn can damage the DNA molecule. In fact, UV-induced reactive oxygen species include singlet oxygen, and probably other non-radical and radical reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide and the superoxide radical [7]. Even the highly reactive hydroxyl radical may be formed by a reaction of hydrogen peroxide with DNA-bounded metals through a Fenton reaction [3].

Oxidative DNA damage, which occurs more effectively with UVA than UVB, has often been suggested as a pre-mutagenic lesion in UVA mutagenesis. Although generally accepted, the impact of DNA damage on the cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic effect of UVA radiation remains unclear. Recent studies have demonstrated a major role of oxidative DNA damage, mostly 7,8-dihydro-8-oxoguanine, in yeast, mammalian cells, and human skin genotoxicity [8-11]. On the other hand, data from recent research employing cultured cells challenges the hypothesis that UVA-induced DNA damage is mostly mediated by oxidative stress, thereby showing that CPDs are more efficiently generated by UVA and are more biologically relevant than oxidatively induced DNA lesions [12,13]. Moreover, only a small fraction of UVA-induced mutations observed in cell culture models were typical of oxidative DNA damage [2]. With cultured primary human fibroblasts, the mutations induced by UVB and UVA were actually quite similar, with a predominance of C – T transitions for both radiations, the sharing of hotspots within runs of pyrimidines, and a

predilection of these mutations for the non-transcribed strand, thus supporting the concept that DNA photoproducts are the major pre-mutagenic lesions not only from UVB but also UVA light [14].

Another type of UV-induced DNA lesion, the single-strand break, is commonly thought to be repaired rapidly and efficiently. They are probably innocuous lesions and may be little involved in the formation of deletions or insertions. This is different from DNA double-strand breaks. However, there is reliable evidence that these lesions are not efficiently induced by UV light [15,16].

In order to better understand and evaluate the biological effects of solar-UV radiation, worldwide efforts are under way in an attempt to develop new biological monitoring systems [17-19]. Since DNA is the main UV target in living organisms, it is quite natural to employ DNA for damage detection. In the present work, we exposed plasmid DNA samples inside polycarbonate Petri dishes to artificial UV lamps (UVC, UVB, and UVA), a common approach in this type of experiment, in order to discriminate and compare the induction of oxidative DNA damage and CPDs, especially by UVB and UVA lamps, with results obtained previously by means of the highly-UV transparent DNA-dosimeter system [16]. Furthermore, the biological effects induced by artificial and natural UV radiation were evaluated by analyzing the plasmid inactivation rate and mutation frequency at the target *supF* gene of the *pCMUT* vector after replication in an *E.coli* *MBL50* strain. The correlations between DNA lesions and these genotoxic effects indicated that CPDs play the main role in the induction of DNA inactivation as well as mutagenesis in this bacterial model.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plasmid and bacterial strains:

The *E. coli* DH10b strain (F^- , *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *80lacZM15*, *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *ara139*, *galU*, *galK*, *rpsL*, *nupG*, *tonA*, *STM^R*) and *E. coli* MBL50 strain (F^- , CA7020, *lacY1*, *hsdR*, *ghsdM*, *galU*, *galK*, *rpsL*, *thi*, *lacZ* (AM), Δ (*araBAC-leu*)7679 *araD⁻* *araC* (AM), *TET^R*) were made electro-competent [20] and transformed with a *pCMUT* vector (1762 bp) (*C* – chloramphenicol resistance, and *MUT* – *supF* mutation target gene) for plasmid DNA purification and analysis of DNA inactivation and mutagenesis, respectively [16]. Purification of DNA samples was prepared by using Qiagen maxi kits (Valencia, USA), and then stored in a TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA).

2.2. UV sources, irradiation of plasmid DNA samples and DNA photoproducts quantification:

The irradiation of drops of a DNA solution deposited on 30 mm plastic cell-culture Petri dishes was carried out in a TE buffer, pH 8.0. A Philips UVC lamp TUV 15W/G15 T8 was used for UVC exposures. UVB irradiation was carried out with a Vilber Loumart T15M 15 W lamp, whereupon, the Petri-dishes containing the plasmid DNA samples were covered with a polycarbonate sheet to filter UVC wavelengths. For UVA radiation, samples were irradiated by an Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W lamp filtered with a Schott BG39 glass filter 3 mm thick (Schott Glass, Germany), plus a polycarbonate sheet. UV dose-rates, irradiance spectra of the UVB and UVA lamps with and without filters according to [21], and sunlight-exposures of the DNA-dosimeter system, have been described previously [16]. In order to determine the

average number of DNA photoproducts generated by the UV lamps and sunlight, the relative amounts of supercoiled and circle plasmid DNA forms were measured after separation by 0.8% agarose gel electrophoresis through densitometry analysis (Image Quant 300, GE Healthcare, USA). Samples with 200 ng of DNA were pre-incubated with 0.8 U of *E. coli* Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg protein from New England Biolabs, Ipswich, USA), and 70 ng of T4 bacteriophage endonuclease V (T4-endo V, produced in this laboratory), to discriminate the different types of DNA lesions. The enzymes were previously tested up to saturation, and were used in amounts where no non-specific cleavage is observed. The number of enzyme sensitive sites per kbp of plasmid DNA was calculated, assuming a Poisson distribution adapted to this technique, as described previously [16].

2.3. Genotoxic effects induced by UV radiation:

2.3.1. Plasmid inactivation rate:

The plasmid inactivation rate was defined as the ability of growing of transformed bacteria with UV-exposed *pCMUT* vector in LB medium added to chloramphenicol by adapting a previously described technique [22]. After light exposure, plasmid samples were transfected into the *E. coli* *MBL50* strain. Samples of transformed bacteria with UV-exposed and non-exposed *pCMUT* vectors were plated onto a LB medium supplemented with chloramphenicol (34 mg/mL). Twenty-four hours later, colonies were counted and the reduction factor (RF = DNA inactivation) determined as follows:

$$\text{DNA inactivation (RF)} = \frac{\text{cfu/ml (untreated sample)}}{\text{cfu/ml (treated sample)}}$$

2.3.2. Mutation frequency of the *supF* gene:

This method is based on a previously described approach [23]. The rationale of the method is that, due to the accumulation of a toxic product, the *MBL50 araD⁻araC(AM)* strain will be sensitive to L-arabinose when transformed with a plasmid carrying an active amber suppressor *supF* gene. By contrast, the *araC(AM)* will remain unsuppressed in the presence of a mutated *supF* gene, thus making the bacteria resistant to L-arabinose. Thereupon, *pCMUT* samples were transfected into this *E. coli* strain by electroporation for selection of the plasmid mutated at the *supF* gene. Selection was undertaken by plating the transfected bacteria onto an M9-agar (1.5%) medium supplemented with L-arabinose (2 g/L), glycerol (2 g/L), thiamine (5 mg/L) and chloramphenicol (34 mg/mL). Only bacteria carrying the vector with the mutated *supF* gene can grow on the L-arabinose plates.

3. RESULTS

3.1. DNA damage and genotoxic effects induced by artificial-UV sources:

To evaluate the induction of CPDs and oxidative damage in plasmid inactivation and mutagenesis, plasmid samples exposed to UVC, UVB and UVA lamps were defined as T4-endo V and Fpg sensitive sites (T4-endo V-SS and Fpg-SS). This was followed by an analysis of the plasmid inactivation rate and mutation induction in the *supF* gene after transfection of the *E. coli MBL50* strain.

The yield of these DNA lesions per kbp induced by UVC, UVB and UVA radiation is presented in Figure 1. As expected, the induction of T4-endo V-SS by UVC and UVB light is efficient, dose dependent and readily detected. On the other hand, for both types of UV irradiation, induction of Fpg-SS was very low and of SSB barely detectable (Figure 1A and 1B). Plasmid samples were also exposed to increasing doses

of UVA radiation to assess their DNA damage profile. It could be seen that the generation of Fpg-SS is higher than T4-endo V-SS and that SSB was also detected (Figure 1C). On contrasting our previous results, also obtained with the DNA-dosimeter system, these results suggest that the rate of oxidized DNA base in plasmid DNA samples irradiated inside plastic Petri dishes was surprisingly higher in comparison to exposures carried out in the silicone based DNA-dosimeter system [16]. Also, the induction of T4-endo V-SS was lower than that observed when plasmid samples were exposed in the DNA-dosimeter system [16].

After treatment with increasing doses of UVC, UVB and UVA radiation, these UV-exposed plasmid samples were transfected into the *E. coli* MBL50 strain, so that by analyzing plasmid inactivation rates and mutation frequency in the *supF* gene, it was possible to assess the capacity of these wavelengths to induce cell death and mutations. These results are presented in Figure 2. It is clear that in UVC and UVB irradiation, inactivation and mutagenesis are dose dependent. On the other hand, these dose dependent responses are not really evident after UVA irradiation.

3.2. Genotoxic effects induced by natural sunlight:

Environmental exposure of plasmid samples within the DNA-dosimeter system was carried out in the south of Brazil (29.4°S, 53.8°W), during two cloudless (December 27th and 29th, 2006), and one cloudy (January 4th, 2007) days, for four continuous hours, from 10:00 am to 2:00 pm. Solar UVB and UVA doses as well as DNA damage profiles obtained through the use of this system directly in the environment, have been presented previously [16]. In order to complement the analyses already undertaken, the induction of genotoxic effects after sunlight exposure is shown in Figure 3.

Consistent with the incidence of solar-UV doses and the profiles of DNA photoproducts previously observed [16], the results presented in Figures 3A and 3B indicate that the quantification of DNA inactivation and mutagenesis correlates well with solar-UV doses.

3.3. The roles of T4-endo V-SS and Fpg-SS in the induction of genotoxic effects:

The relative roles played by photoproducts, as well as oxidative damage in genotoxic effects were determined by direct correlation between DNA damage and biological effects in all the experimental UV-exposure conditions performed. These correlations are presented in Figure 4.

Basically, it can be clearly seen from Figures 4A and 4B that, independent of irradiation conditions, the induction of biological effects, plasmid inactivation and mutagenesis are directly related to the presence of large distorting DNA lesions, in this case T4-endo V-SS, and that the magnitude of these effects are also associated with the amount of this type of photoproduct in DNA molecules. On the other hand, as shown in Figures 4C and 4D, oxidative damage (Fpg-SS) does not indicate any correlation with the induction of these biological processes in this bacterial model. Although these correlations are more apparent in the case of both UVB and UVC (which induce higher amounts of T4-endo V-SS), with UVA irradiation, it is clearly indicated that only the T4-endo V-SS leads to plasmid inactivation and mutagenesis, since its low efficiency for inducing CPD should be the responsible for the smaller and non-dose dependent response of these biological effects after UVA treatment.

4. DISCUSSION

The biological effects of UVC and UVB radiation, including cell-death and mutagenesis, are relatively well understood in bacteria and in mammalian cells [24-26].

However, the UV portion of sunlight is approximately 95% UVA, and in contrast to UVC and UVB radiation, DNA damage and mutations induced by UVA is still a matter for debate.

The *supF* gene of *E. coli* has been widely used as a mutagenic target in several shuttle-vector plasmids. The widespread use of this tRNA suppressor gene for studies of several DNA reactive agents has produced a large database of mutation spectra, through its application as a mutation reporter in mammalian cells, yeast, *E. coli*, and transgenic mice [23,27-29].

In order to better understand the respective contribution of each UV portion of the solar spectrum and its genotoxic effects on an *E. coli* model, it was of interest to establish the profiles of induction DNA photoproducts in plasmid DNA carrying *supF* genes after exposure to UVC, UVB, UVA and sunlight.

DNA damage profiles have already been established in plasmid DNA using DNA repair enzymes and the plasmid relaxation assay, following exposure to UVC, UVB, UVA and simulated sunlight [3]. In the present study, and by using basically the same methodology to detect UV-induced DNA damage, we could also observe the induction of T4-endo V-SS in all DNA-irradiated samples (UVC, UVB, and UVA), thus demonstrating the formation of CPDs (Figures 1A, 1B, and 1C). The induction of CPDs by UVB lamps was very high and similar to UVC treatments (Figures 1A and 1B). In accordance with several previous reports [3,5,13,26,30,31], we presented evidence that CPDs are also generated by UVA radiation (Figure 1C). However, both the amount of this type of DNA photoproduct, as well as, the profile of DNA damage observed after UVA exposure, were different from those presented in our previous work [16]. The higher amount of oxidative damage induced by UVA in comparison with UVC and UVB radiation may be related to the possibility that hydroxyl radicals had been

produced by Haber-Weiss and Fenton reactions, thus implying traces of iron bounded to DNA [3], although, when plasmid DNA samples were exposed to the same UVA source within the DNA-dosimeter system, the amount of Fpg-SS was significantly lower for similar doses [16]. Therefore, the higher production of oxidative damage and single strand breaks observed here (Figure 1C) may be due to the presence of contaminant chromophores in plastic Petri dishes. This hypothesis was put forward earlier, when the formation of hydrogen peroxide was detected after UVA irradiation of the DNA solution in plastic Petri dishes, but, interestingly, was not detected when this was done on glass Petri dishes, since the surfaces had been extensively cleaned [3].

UV mutagenesis is characterized by the high frequency of transition mutations at dipyrimidine sequences, implicating dimeric pyrimidine photoproducts containing cytosine as the mutagenic lesion [32,33]. CPD is believed to be the major mutagenic lesion in mammalian cells owing to its high levels of induction, slow repair and probably high bypass tolerance [32,34]. The contribution of 6-4PPs to UV mutagenesis is essentially unknown, but when using foreign photolyases genes (CPD or 6-4PP photolyase) in a set of DNA proficient repair mouse cell lines, CPDs were found to be responsible for >80% of UVB induced mutation and 6-4PPs were possibly so for the remainder [35].

The genotoxicity of UVA has most commonly been attributed to endogenous photosynthesizers causing reactive oxygen species-mediated induction of DNA damage [26]. However, more recently, it has been reported that UVA can induce CPDs in mammalian cells [5,12,13]. Therefore, UVA-induced mutagenesis has been assessed in reporter genes in bacteria and mammalian cells, although the results have not always been in agreement, thereby suggesting that a direct link between UVA-induced DNA damage and mutagenesis is not, as yet, clearly established [26]. Oxidative DNA

damage, which occurs more efficiently with UVA than with UVB, has often been considered as a premutagenic lesion in UVA mutagenesis [36,37]. However, with cultured primary human fibroblasts, the mutations induced by UVB and UVA were actually quite similar, with a predominance of C – T transitions for both, the sharing of hotspots within runs of pyrimidines, and the predilection of these mutations for the nontranscribed strand, thus supporting the concept of DNA photoproducts being the major pre-mutagenic lesion not only for UVB but also for UVA [14].

Through the use of the L-arabinose resistant method, it was possible to detect low mutation frequencies, thus permitting the use of the *supF* gene for mutagenesis studies following UVA irradiation. Both plasmid inactivation and mutagenesis induced by UVA (Figures 2C and 2F) were significantly less, when compared to UVC and UVB treatments (Figures 2A, 2D, 2B, and 2E, respectively), thus indicating the low efficiency of UVA lamps for inducing CPDs, when plasmid DNA samples were exposed inside a polycarbonate Petri dish. An increase in these biological effects was observed for all sources of UV irradiation.

The genotoxic effects induced by sunlight (Figure 3) are in total agreement with the measurement of solar-UV doses by physical radiometers and the amount of DNA lesions detected by DNA repair enzymes and specific antibodies, after each day of environmental exposure [16].

Therefore, in order to investigate the role of photoproducts (T4 endo V-SS) and oxidative damages (Fpg-SS) in the induction of DNA inactivation and mutagenesis, correlations between the available biochemical and biological data, considering all UV-exposures undertaken, underwent analysis. Correlation coefficients clearly showed there to be a direct relationship between the efficiency to generate CPDs by different UV sources and the induction of genotoxic effects. Furthermore, there were also indications

that the magnitudes of DNA inactivation and mutagenesis in this *E. coli* model were only related to the amount of CPDs generated in the DNA molecule, and not to oxidative damage (Figure 4). Although the experimental DNA-based approach used in the present study can lead to some criticisms concerning the lack of endogenous photosensitizers in this cell-free environment, the question on the relevance of CPD versus oxidative lesions, specially for long wavelength of UV radiation, has been matter of debate, and the strong correlation with the biological effects evaluated here (plasmid inactivation and mutagenesis) with the amount of CPDs are original and contribute to the discussion. Thus, through the use of this simple and reproducible methodology, we were able to demonstrate that distorting DNA CPDs lesions are mainly responsible for UV-genotoxicity, when considering the whole UV spectrum studied here, and that UV-induced non-distorting DNA oxidative damages are apparently unassociated with the induction of DNA inactivation and mutagenesis.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (São Paulo, Brazil) and CNPq (Brasília, Brazil).

REFERENCES

- [1] A. Strydom, A. Sarasin, Ultraviolet A- and singlet oxygen-induced mutation spectra, *Methods Enzymol* 319 (2000) 153-165.
- [2] T.M. Runger, U.P. Kappes, Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA), *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24 (2008) 2-10.
- [3] Z. Kuluncsics, D. Perdiz, E. Brulay, B. Muel, E. Sage, Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts, *J Photochem Photobiol B* 49 (1999) 71-80.
- [4] A. Ziegler, D.J. Leffell, S. Kunala, H.W. Sharma, M. Gailani, J.A. Simon, A.J. Halperin, H.P. Baden, P.E. Shapiro, A.E. Bale, et al., Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 4216-4220.
- [5] D. Perdiz, P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, E. Sage, Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis, *J Biol Chem* 275 (2000) 26732-26742.
- [6] J. Piette, M.P. Merville-Louis, J. Decuyper, Damages induced in nucleic acids by photosensitization, *Photochem Photobiol* 44 (1986) 793-802.
- [7] D. Darr, I. Fridovich, Free radicals in cutaneous biology, *J Invest Dermatol* 102 (1994) 671-675.
- [8] S. Kozmin, G. Slezak, A. Reynaud-Angelin, C. Elie, Y. de Rycke, S. Boiteux, E. Sage, 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* 102 (2005) 13538-13543.
- [9] J. Dahle, G. Brunborg, D.H. Svendsrud, T. Stokke, E. Kvam, Overexpression of human OGG1 in mammalian cells decreases ultraviolet A induced mutagenesis, *Cancer Lett* 267 (2008) 18-25.
- [10] N.S. Agar, G.M. Halliday, R.S. Barnetson, H.N. Ananthaswamy, M. Wheeler, A.M. Jones, 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* 101 (2004) 4954-4959.
- [11] A. Javeri, X.X. Huang, F. Bernerd, R.S. Mason, G.M. Halliday, Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1 protein and gene are expressed more abundantly in the superficial than basal layer of human epidermis, *DNA Repair (Amst)* 7 (2008) 1542-1550.
- [12] T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, E. Sage, Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation, *Biochemistry* 42 (2003) 9221-9226.
- [13] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 13765-13770.
- [14] U.P. Kappes, D. Luo, M. Potter, K. Schulmeister, T.M. Runger, Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells, *J Invest Dermatol* 126 (2006) 667-675.
- [15] J. Dunn, M. Potter, A. Rees, T.M. Runger, Activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway and recombination repair in the cellular response to solar ultraviolet light, *Cancer Res* 66 (2006) 11140-11147.

- [16] A.P. Schuch, R. da Silva Galhardo, K.M. de Lima-Bessa, N.J. Schuch, C.F. Menck, Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation, *Photochem Photobiol Sci* 8 (2009) 111-120.
- [17] N. Munakata, S. Cornain, M. Kanoko, K. Mulyadi, S. Lestari, W. Wirohadidjojo, D. Bolsee, S. Kazadzis, V. Meyer-Rochow, N. Schuch, C. Casiccia, M. Kaneko, C.M. Liu, K. Jimbow, T. Saida, C. Nishigori, K. Ogata, K. Inafuku, K. Hieda, M. Ichihashi, Biological monitoring of solar UV radiation at 17 sites in Asia, Europe and South America from 1999 to 2004, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 689-694.
- [18] P. Rettberg, C.S. Cockell, Biological UV dosimetry using the DLR-biofilm, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 781-787.
- [19] A. George, H. Peat, A. Buma, Evaluation of DNA dosimetry to asses ozone-mediated variability of biologically harmful radiation in Antarctica. , *Photochem. Photobiol.* 76 (2002) 274-280.
- [20] K.A. Datsenko, B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97 (2000) 6640-6645.
- [21] P. Grof, G. Ronto, E. Sage, A computational study of physical and biological characterization of common UV sources and filters, and their relevance for substituting sunlight, *J. Photochem. Photobiol. B* 68 (2002) 53-59.
- [22] A. Aertsen, C.W. Michiels, Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 58 (2005) 1381-1391.
- [23] R.R. Ariza, T. Roldan-Arjona, C. Hera, C. Pueyo, A method for selection of forward mutations in *supF* gene carried by shuttle-vector plasmids, *Carcinogenesis* 14 (1993) 303-305.
- [24] E. Sage, B. Lamolet, E. Brulay, E. Moustacchi, A. Chteauneuf, E.A. Drobetsky, Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 176-180.
- [25] W.B. Mak, D. Fix, DNA sequence context affects UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutat Res* 638 (2008) 154-161.
- [26] G.P. Pfeifer, Y.H. You, A. Besaratinia, Mutations induced by ultraviolet light, *Mutat Res* 571 (2005) 19-31.
- [27] Y. Zhao, L. Goriparthi, H.B. Lieberman, A new shuttle vector system for the identification of spontaneous and radiation-induced mutations in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Mutat Res* 311 (1994) 111-123.
- [28] N.M. King, G.G. Oakley, M. Medvedovic, K. Dixon, XPA protein alters the specificity of ultraviolet light-induced mutagenesis in vitro, *Environ Mol Mutagen* 37 (2001) 329-339.
- [29] K.A. Canella, M.M. Seidman, Mutation spectra in *supF*: approaches to elucidating sequence context effects, *Mutat Res* 450 (2000) 61-73.
- [30] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations, *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 836-844.
- [31] R.M. Tyrrell, R.D. Ley, R.B. Webb, Induction of single-strand breaks (alkali-labile bonds) in bacterial and phage DNA by near UV (365 nm) radiation, *Photochem Photobiol* 20 (1974) 395-398.
- [32] G.P. Pfeifer, Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment, *Photochem Photobiol* 65 (1997) 270-283.

- [33] E. Sage, Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context, *Photochem Photobiol* 57 (1993) 163-174.
- [34] R.E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, *Poleta, Science* 283 (1999) 1001-1004.
- [35] Y.H. You, D.H. Lee, J.H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui, G.P. Pfeifer, Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells, *J Biol Chem* 276 (2001) 44688-44694.
- [36] A. Besaratinia, S.E. Bates, T.W. Synold, G.P. Pfeifer, Similar mutagenicity of photoactivated porphyrins and ultraviolet A radiation in mouse embryonic fibroblasts: involvement of oxidative DNA lesions in mutagenesis, *Biochemistry* 43 (2004) 15557-15566.
- [37] A. Besaratinia, T.W. Synold, B. Xi, G.P. Pfeifer, G-to-T transversions and small tandem base deletions are the hallmark of mutations induced by ultraviolet a radiation in mammalian cells, *Biochemistry* 43 (2004) 8169-8177.

Figure legends

Figure 1: Induction of DNA photoproducts after exposure to UVC (A), UVB (B), and UVA (C) radiation. The results represent the average and standard deviation of three independent experiments. SSB – single strand breaks; Fpg-SS – Fpg sensitive sites; T4-endo V-SS – T4-endo V sensitive sites.

Figure 2: Plasmid DNA inactivation rate and mutation induction of *supF* gene after exposure to UVC (A) and (D), UVB (B) and (E), UVA (C) and (F), respectively, and after replication of the *pCMUT* vector in the *E. coli MBL50* strain. RF – reduction factor.

Figure 3: Determination of the plasmid DNA inactivation rate (A) and mutation frequency of *supF* gene (B) after exposure of the DNA-dosimeter system to environmental sunlight and after replication of the *pCMUT* vector in the *E. coli MBL50* strain. The solar UVB/UVA radiation doses for each day of environmental exposures were measured by specific UVB and UVA Radiometers (EKO Instruments Trading Co. Ltd., Japan), and it corresponds to: 5.2 kJ/m² UVB, and 191 kJ/m² UVA (12/27/2006); 4.8 kJ/m² UVB, and 177 kJ/m² UVA (12/29/2006); 2.3 kJ/m² UVB, and 81 kJ/m² UVA (01/04/2007). RF – reduction factor.

Figure 4: The role of DNA photoproducts in the induction of DNA inactivation and mutagenesis in the *E. coli MBL50* strain after exposure of plasmid DNA samples to UVC, UVB, UVA and natural sunlight. **A.** Correlation between T4-endo V-SS induction and DNA inactivation. **B.** Correlation between T4-endo V-SS induction and mutation frequency of the *supF* gene. **C.** Correlation between Fpg-SS induction and DNA inactivation. **D.** Correlation between Fpg-SS induction and mutation frequency of the *supF* gene. RF – reduction factor.

Figure 1.

Figure(s)

Figure 2.

Figure(s)

Figure 3

Figure(s)

Figure 4.