ANITA MARZZOCO

CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA DE UMA AMEBA
DE VIDA LIVRE (*Acanthamoeba castellanii*)

Tese de Doutorado
Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Departamento de Bioquímica

Para Cristina de Paiva Mendonça Pereira
 Antonio Lemos Pereira
 José Gaspar Marzzoco

Índice

	Página
I . Prefácio.....	1
II . Abreviaturas.....	3
III . Reagentes.....	4
IV . Introdução	
1. <u>Acanthamoeba castellanii</u>	5
2. Organização do genoma em eucariotos.....	9
3. Caracterização do genoma de <u>A. castellanii</u>	24
V . Métodos	
1. Crescimento de <u>A. castellanii</u>	30
2. Encistamento.....	32
3. Germinação (Excistamento).....	33
4. Isolamento de núcleos de trofozoito.....	33
5. Controle da pureza das preparações de nú- cleos.....	35
6. Dosagem de RNA, DNA e proteína em núcleos e homogenato.....	36
7. Ensaio da atividade de RNA polimerase (E.C.2.7.7.6).....	37
8. Purificação de mitocôndrias.....	38
9. Extração de DNA.....	39
10. Centrifugação em gradientes de CsCl.....	40
11. Fragmentação de DNA.....	41
12. Avaliação de peso molecular.....	41
13. Renaturação de DNA.....	42
14. Curvas de desnaturação térmica (Determina- ção de T_m).....	43
VI . Resultados	
1. Curva de crescimento.....	44
2. Encistamento induzido.....	46
3. Isolamento de núcleos.....	47
4. Composição química de núcleos isolados....	51
5. Atividade de RNA polimerase (E.C.2.7.7.6) em núcleos isolados.....	51

6. Extração de DNA.....	53
7. Centrifugação em gradientes de CsCl.....	55
8. Perfil de fusão dos componentes do DNA de trofozoitos.....	66
9. Renaturação de DNA.....	70
VII . Discussão	
1. Isolamento de núcleos.....	86
2. Extração de DNA.....	87
3. Caracterização do DNA de trofozoitos	
a) DNA total.....	88
b) DNA nuclear e componente maior.....	90
c) DNA mitocondrial e componente menor.....	91
4. Análise das condições de renaturação.....	96
VIII. Resumo.....	99
IX . Bibliografia.....	100

I. Prefácio

Este trabalho foi realizado sob a orientação segura e eficiente do Prof. Dr. Walter Colli e contou com a colaboração de várias pessoas as quais agradeço imensamente:

Dr. Antonio Sesso - microscopia eletrônica
Aparecido M. Pinto - assistência técnica
Dr. Bayardo B. Torres - leitura do manuscrito
Carmen M. Pinto - assistência técnica
Dra. Gláucia M. Santelli - microscopia de fase
Dra. Godeleine Fonty (Laboratório do Dr. G. Bernadi , Institut de Biologie Moléculaire, Fac. des Sciences de Paris) - ultracentrifugação analítica
Dra. Helena Li Chum - análise da cinética de renaturação
Dra. Janne Balsamo - análise da cinética de renaturação
João Luiz Musa - fotografias
Prof. Dr. José Ferreira Fernandes - adaptação ao novo regime de pós-graduação.
Dra. Lor Cury - microscopia eletrônica
Lucy Bouquet - gráficos
Dr. Luiz Longhi - microscopia eletrônica
Dra. Marilda Guedes - análise estatística dos dados
Masuko Yokoyama - participação na fase inicial do trabalho
Dr. Roberto V. Santelli - ensaio de RNA polimerase

Agradeço, ainda, ao pessoal do Bloco 10 (terreo e superior), especialmente aos colegas do nosso laboratório, sempre dispostos a prestar qualquer tipo de auxílio:

Bianca Zingales
Clara Carniol
Júlia M. Alves
Marinei F. Gonçalves
Muna C. Andery
Neemias de Castro
Shigueko Somohara

Os bacteriófagos T₇ e fd, foram gentilmente cedidos pelos Drs. M. Oishi e L. Day, respectivamente. O inóculo inicial de Acanthamoeba castellanii, linhagem Neff, foi uma doação do Dr. M. Rabinovitch.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Conselho Nacional de Pesquisas.

II. Abreviaturas

DNA = ácido desoxirribonucleico
GC = fração molar de guanina e citosina do ácido nucleico
AT = fração molar de adenina e timina do ácido nucleico
 T_m = temperatura de fusão do DNA
Cot = produto da concentração de DNA (moles de nucleotí
dios. l^{-1}) pelo tempo (segundos) de incubação
RNA = ácido ribonucleico
rRNA = RNA ribossômico
mRNA = RNA mensageiro
rDNA = cistrons complementares a RNA ribossômico
RNase = ribonuclease
DNase = desoxirribonuclease
Tris = tris(hidroximetil) aminometano
EDTA = ácido etileno diamino tetracético
SDS = dodecil sulfato de sódio
TCA = ácido tricloroacético
PCA = ácido perclórico
SSC = NaCl 0,15 M; citrato de sódio 0,015 M, pH 7
PPO = 2,5-difeniloxazol
POPOP = 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benzeno
PVP = polivinil pirrolidona

III. Reagentes

Além das drogas relacionadas abaixo, utilizam-se sempre reagentes de grau analítico.

DROGA	PROCEDÊNCIA
Proteose-peptona	Oxoid Ltd.
Extrato de levedo	Difco Lab.
Citrato férrico	BDH Chem. Ltd.
Silicone	Clay-Adams, Inc.
Triton X-100	Calbiochem
PVP	Calbiochem
RNase	Sigma Chem. Comp.
α -amilase	Sigma Chem. Comp.
Ditiotreitol	Sigma Chem. Comp.
Actinomicina D	Calbiochem
Rifampicina	Ciba-Geigy
PPO	Calbiochem
POPOP	Calbiochem
Nonidet P-40	Shell do Brasil S.A.
Hidróxido de hiamina	Packard Inst. Co., Inc.
Tween 80	BDH Chem. Ltd.
Fenol	Mallinckrodt Chem. Works
^3H -UTP	New England Nuclear Co.
CsCl ("grade A")	Calbiochem
Pronase	Calbiochem
2-desoxi-D-ribose	E. Merck A.G. Darmstadt
D-ribose	E. Merck A.G. Darmstadt
Albumina sérica bovina	Sigma Chem. Comp.

IV. Introdução

1. Acanthamoeba castellanii

O protozoário em estudo denomina-se Acanthamoeba castellanii (Douglas, 1930), linhagem Neff e pertence à família das Hartmannellidae, que compreende cerca de trinta espécies provenientes do desmembramento de um grupo de amebas denominadas anteriormente "limax" (Vickerman, 1962).

A taxonomia das amebas apresenta inúmeras dificuldades e a ameba em questão, durante algum tempo, foi referida na literatura como Acanthamoeba sp. Segundo Volkonsky (1931), Adam (1964) e Page (1967), várias denominações referem-se à mesma espécie: Acanthamoeba castellanii, Acanthamoeba sp., Hartmannella rhysodes, Hartmannella culbertsoni e Hartmannella castellanii.

A. castellanii foi descoberta por Castellani (1930), como contaminante de culturas de Cryptococcus pararoseus e foi assim denominada por Douglas (1930). Posteriormente, a ameba foi isolada de diferentes fontes: solos úmidos (Singh, 1949; Neff, 1957), água doce (Page, 1967) e culturas de tecidos (Jahnes et al., 1957; Moore e Hlinka, 1968). Demonstrou-se claramente sua patogenicidade em macacos e camundongos (Dunnebacke e Williams, 1967; Culbertson et al., 1958, 1959). Vários autores sugerem que a ameba seja o agente etiológico de várias doenças respiratórias do homem, além de meningoencefalites (Wang e Feldman, 1961; Patras e Andujar, 1966; Armstrong e Pereira, 1967; Carter, 1968; Cerva e Novak, 1968).

A divisão celular da ameba segue o curso de uma mitose típica, evidenciando-se a existência de 40 cromossomos (Volkonsky, 1931; Singh, 1952). Todavia, pode-se induzir experimentalmente a divisão celular sem mitose nuclear (amitose): o núcleo único interfásico é par-

tilhado entre as células filhas que sobrevivem por apenas 48 horas (Band et al., 1970). A ameba é tipicamente uninucleada (Bowers e Korn, 1968), mas indivíduos multinucleados podem aparecer sob determinadas condições de cultura (James e Byers, 1967; Band et al., 1970; Band e Machemer, 1963). Portanto, a divisão citoplasmática pode ser separada da divisão nuclear mitótica, fazendo com que a ameba se torne um sistema útil para o estudo de problemas de divisão celular (Band e Mohrlök, 1973 a; 1973 b). Band e Mohrlök (1973 b) demonstraram que as fases de mitose e síntese de DNA, duravam, respectivamente, 24 e 20 minutos. Resultados semelhantes foram obtidos em Physarum (Nygaard et al., 1960) e ouriço do mar (Hinegardner et al., 1964).

A. castellanii pode ser cultivada, sob condições axênicas, em vários meios líquidos (Neff et al., 1958; Band, 1959, 1962), com temperatura ótima entre 25 e 30 °C. Nessas condições, o tempo de geração varia de 12 a 18 horas (Neff et al., 1964 b). O crescimento pode ser obtido em meio basal mínimo (Adam, 1959; Stark, 1966). Cresce também em placas sobre culturas de bactérias ou fungos, permitindo a obtenção de clones e reconhecimento de mutantes pela morfologia da colônia (Jensen e Dubes, 1962; Upadhyay, 1968).

Culturas agitadas ou estacionárias em meio líquido apresentam curvas de crescimento onde não se verifica uma fase de "lag". As fases (exponencial e estacionária) da curva de crescimento são determinadas, principalmente, pelo nível de oxigênio dissolvido no meio (Neff et al., 1958; Band, 1959; Byers et al., 1969).

Sob determinadas condições ambientais, a ameba sofre um processo de diferenciação que culmina com a formação de um novo tipo celular, o cisto. O encistamento pode ser espontâneo ou induzido. O encistamento espontâneo ocorre em culturas agitadas ou estacionárias, em condições de alta densidade de células. A indução do encistamento é obtida através do emprego de técnicas de substituição de meios, ou seja, as amebas são transferidas de um meio nutriente rico para um meio

salino, deficiente em fontes de carbono ou nitrogênio (Griffiths e Hughes, 1969). O encistamento também pode ser obtido em placas de agar não nutriente, contendo taurina e cloreto de magnésio (Raizada e Krishna Murti, 1971). Encistamento adequado requer oxigênio, presença de íons cálcio e magnésio e baixa concentração de células (Band, 1963; Griffiths e Hughes, 1968).

As fases do encistamento espontâneo e induzido são praticamente as mesmas, mas a indução proporciona encistamento em massa (acima de 95%, após 20 horas de indução) e sincronizado (Neff et al., 1964 b). O trofozoito, envolto por uma membrana plasmática (Korn e Wright, 1973), diferencia-se em uma célula viável e extremamente resistente (Adam, 1964; Neff et al., 1964 b), protegida por uma parede celular química e estruturalmente complexa. A parede, cuja composição química ainda não foi totalmente elucidada, contém, como elemento predominante, celulose (Tomlinson e Jones, 1962; Neff e Benton, 1962; Page, 1967; Tomlinson, 1967; Neff e Neff, 1969), além de proteína (Neff et al., 1964 a; Bowers e Korn, 1969) e mucopolissacarídeos (Krishna Murti, 1973).

O encistamento ocorre em condições onde a célula não dispõe de qualquer suprimento exógeno e os componentes da parede não estão presentes no trofozoito. Evidências citológicas (Bowers e Korn, 1969) e bioquímicas (Neff e Neff, 1969; Griffiths e Hughes, 1969; Weisman et al., 1970) indicam que a celulose é sintetizada "de novo", às expensas de glicogênio que constitui o material de reserva do trofozoito (Stark, 1966). A atividade de β -glicana sintetase não é detectável no trofozoito (Potter e Weisman, 1971).

A produção de moléculas exóticas no encistamento é acompanhada por outras alterações metabólicas (Weisman e Moore, 1969; Krishna Murti, 1973) e morfológicas (Vickerman, 1962; Bowers e Korn, 1969; Pasternak et al., 1970), além do término do crescimento celular (Neff et al., 1964 b; Stevens e Pachler, 1973 b).

As alterações no nível de macromoléculas que ocorrem no fim da fase logarítmica, antes do aumento da proporção de cistos, podem ser correlacionadas com eventos ligados ao encistamento. Células em fase estacionária possuem metade da quantidade de DNA verificada durante a fase logarítmica (Byers et al., 1969), fenômeno esse que coincide com a diminuição da velocidade de síntese de DNA (Rudick, 1971). A queda de 50% no conteúdo de DNA por célula poderia ser explicada, admitindo-se que a maioria das amebas em fase logarítmica contivesse a quantidade de DNA da fase G_2 e que o ciclo de duplicação celular fosse inibido durante a fase estacionária, no período G_1 , ou na transição entre os períodos G_1 e S. Essa hipótese foi reforçada pelos trabalhos de Neff e Neff (1969), Rudick (1971) e Band e Mohrlök (1973 b), que demonstram que o período G_2 constitui cerca de 80% do ciclo de divisão celular. Situação semelhante foi verificada em Amoeba proteus (Goldstein e Prescott, 1967). A conclusão adicional desses trabalhos é que a indução do encistamento dependeria da redução da quantidade de DNA por célula e que inibidores de síntese de DNA induziriam o encistamento. Por outro lado, outros autores (Griffiths e Hughes, 1969; Raizada e Krishna Murti, 1971), verificam inibição do encistamento por esses mesmos agentes. Experimentos recentes (Roti Roti e Stevens, 1973), demonstram também que, durante o encistamento, ocorre degradação de DNA sintetizado durante a fase de crescimento exponencial.

Os dados referentes à síntese de RNA durante o encistamento são igualmente contraditórios. Para alguns autores, o aparecimento de compostos peculiares ao cisto, seria uma indicação da necessidade de síntese de novas moléculas de RNA e proteína. Realmente, Rudick e Weisman (1973 a), verificam um acúmulo de RNA durante as primeiras 12 horas após indução. Posteriormente, a síntese de RNA é interrompida e 95% do RNA sintetizado inicialmente é degradado. Stevens e Pachler (1973 a, b) apresentam resultados opostos, demonstrando que um acúmulo de RNA não é indispensável

para a indução e que o RNA degradado é constituído por espécies sintetizadas antes do encistamento. Segundo esses autores, a indução da diferenciação estaria intimamente relacionada com os eventos moleculares que regulam a divisão celular, já que o encistamento (espontâneo ou induzido) ocorre sempre em condições que determinam a inibição do crescimento.

Finalmente, o AMP cíclico parece estar relacionado com a indução do encistamento (Raizada e Krishna Murti, 1972 a). O AMP mimetiza a ação de taurina e cloreto de magnésio (Raizada e Krishna Murti, 1972 b), que ativariam uma adenil ciclase ligada à membrana. O aumento resultante da concentração intracelular de AMP cíclico, causaria a ativação das enzimas de síntese de celulose e mucopolissacarídeos da parede do cisto (Krishna Murti, 1973).

Os cistos, quando transferidos para meio de crescimento, podem germinar (Griffiths e Hughes, 1968). A ameba sai por um dos ostíolos presentes na parede do cisto e, a não ser pela formação desse pequeno orifício, a superfície do cisto permanece inalterada após o excistamento (Page, 1967; Chambers e Thompson, 1972). O excistamento parece não ser sincrônico e a extrusão da ameba é inibida por actinomicina D e cicloheximida, enquanto que inibidores de síntese de DNA não afetam o processo (Mattar e Byers, 1971).

2. Organização do genoma em eucariotos

DNA, cuidadosamente isolado de células ou tecidos, é constituído por moléculas bicatenárias, denominadas "nativas". A dupla hélice da molécula nativa pode dar origem a fitas separadas, com estrutura desordenada, através da ação de agentes químicos ou físicos que determinam o rompimento das forças que mantêm a dupla hélice. Esse processo de dissociação (ou desnaturação) é acompanhado por mudanças nas propriedades físicas do DNA: viscosidade, hipocromicidade, rotação óptica, den-

sidade etc. A transição entre o estado nativo e desnaturado é abrupta, semelhante à fusão de um cristal, o que determinou a caracterização do processo pela temperatura média da transição (T_m). A largura da transição depende da origem do DNA, ou seja, DNA de vírus, bactérias e vertebrados, apresentam intervalos de transição crescentes. Sob condições adequadas, as fitas complementares dissociadas podem formar moléculas estáveis com estrutura helicoidal semelhante à nativa por um processo denominado renaturação ou reassociação (Marmur e Doty, 1961). É possível também verificar interação entre fitas de RNA e DNA, desde que existam sequências de bases complementares nos dois ácidos nucleicos, permitindo a formação de híbridos RNA-DNA.

A velocidade de renaturação depende da colisão de sequências de nucleotídeos complementares e a reação obedece cinética de segunda ordem em concentração de DNA (Marmur et al., 1963; Britten e Kohne, 1967; Thrower e Peacocke, 1968; Wetmur e Davidson, 1968). O processo de renaturação pode ser acompanhado de diversas maneiras, sempre dependendo de alguma diferença física facilmente detectável entre o DNA desnaturado e renaturado. Assim, é possível acompanhar a reassociação de DNA pela determinação da queda de absorbância a 260 nm durante a reação (Wetmur e Davidson, 1968), pela recombinação de fragmentos de DNA desnaturado com DNA de alto peso molecular fisicamente imobilizado em agar (Bolton, 1966) ou pela fração de DNA reassociado que se liga a colunas de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) em diferentes tempos de reação (Britten e Kohne, 1967).

A velocidade da reação de renaturação é determinada pela concentração das sequências de nucleotídeos presentes. Considerando-se diversos organismos, o DNA daquele com genoma maior, certamente conterá um número maior de sequências de nucleotídeos diferentes. Assim sendo, a velocidade de reassociação fornece uma medida do tamanho do genoma de um organismo, desde que sejam mantidos constantes todos os demais fatores que influem na reação (temperatura, for-

ça iônica, pH, viscosidade do solvente, tamanho dos fragmentos e teor de GC do DNA). Realmente, o tempo necessário para a obtenção de 50% de renaturação é inversamente proporcional ao tamanho do genoma (conteúdo haplóide de DNA por célula ou partícula de vírus) de bactérias e vírus (Britten e Kohne, 1967). No caso dos organismos superiores, imaginou-se, inicialmente, que o tamanho do genoma levaria a uma grande diluição das sequências individuais de nucleotídeos e haveria, portanto, grande redução na velocidade de reassociação, quando comparada com a velocidade característica de DNA de bactérias. De fato, experiências iniciais não conseguiram evidenciar renaturação de DNA de timo de boi (Marmur e Doty, 1961). Posteriormente, através do emprego da técnica DNA-agar, verificou-se que DNA de organismos superiores reassociava efetivamente, formando moléculas duplas específicas (Hoyer et al., 1964). A explicação mais plausível para esse fato, até então inesperado, deveria se relacionar com a concentração de sequências capazes de renaturar, ou seja, o genoma de organismos superiores conteria populações de sequências de nucleotídeos semelhantes ou idênticas (sequências repetidas ou reiteradas). Todos os organismos superiores analisados até hoje, contêm DNA repetido em proporções que variam, por exemplo, de 20% em ouriço do mar a 80% em salmão e trigo (cf. Britten, 1970). A lista de organismos que possuem DNA reiterado aumenta muito, se forem considerados os trabalhos realizados inicialmente, que utilizavam condições de reassociação (tempo de incubação e concentração de DNA) que permitiam somente a renaturação de DNA repetido.

A renaturação do DNA de organismos mais simples como por exemplo Escherichia coli, segue cinética ideal de segunda ordem, obtendo-se uma curva hiperbólica com o decurso do tempo. A renaturação de DNA de organismos superiores apresenta uma curva muito alargada, indicando a existência de componentes com velocidades de renaturação diferentes. Uma fração do DNA de organismos superiores (DNA "único"), renatura com a velocidade prevista segundo o tamanho do genoma, por exemplo, em mamíferos, cerca de 600 vezes menor que a do DNA de E. coli. Assim

sendo, para DNA de bactérias e vírus e a fração de DNA "único" de organismos superiores, a complexidade cinética é igual à complexidade de sequência, ou seja, a quantidade de sequências diferentes em uma determinada amostra de DNA. É geralmente expressa em número de pares de nucleotídeos ou número de daltons e corresponde ao termo "complexidade", definido por Wetmur e Davidson (1968). A complexidade cinética traduz, portanto, o tamanho do genoma de um organismo e mostra uma relação linear com a velocidade de reassociação (Britten e Kohne, 1967; Wetmur e Davidson, 1968). A determinação da complexidade cinética do DNA único é prejudicada pela delimitação incerta da fração única e repetida de um DNA, que depende do critério de precisão de pareamento estabelecido durante a medida da velocidade de reassociação (Britten, 1971).

Apesar da maior parte do genoma bacteriano ser constituída por sequências que não se repetem (sequências "únicas"), foi demonstrada a existência de uma pequena fração de DNA com baixa frequência de reiteração, responsável pela síntese de rRNA (Kohne, 1969), além de cópias múltiplas de DNA epissômico (Chiscon e Kohne, 1970).

A definição de eucariotos e procariotos, baseada principalmente na existência ou não de um núcleo verdadeiro, delimitado por uma membrana nuclear, pode, a partir do estudo da reassociação de ácidos nucleicos, ser formulada em outros termos: o DNA de procariotos é do tipo não repetitivo (exceto por pequenas quantidades de DNA ribossômico e epissômico), enquanto que o DNA de eucariotos é constituído por sequências repetidas e sequências "únicas".

Uma família de DNA reiterado pode ser caracterizada pelo número de membros (frequência de reiteração), grau de semelhança entre os elementos componentes e pela complexidade cinética.

A velocidade de reassociação das famílias de sequências repetidas estudadas varia de 30 (DNA de ouriço do mar, Britten et al., 1972) a 10^7 vezes (DNA de cabaia, Southern, 1970) maior que a velocidade de

reassociação de um DNA único. Esses dados ilustram a diversidade de frequências de reiteração encontradas nos organismos superiores.

A precisão do pareamento entre sequências repetidas reflete o grau de homologia existente entre as sequências e pode ser medida pela estabilidade térmica do par reassociado. Verifica-se um largo espectro de estabilidades térmicas, incluindo valores de T_m de 1 a 40°C abaixo do T_m de um DNA perfeitamente pareado. O grau de precisão de pareamento das sequências reiteradas é fundamentalmente determinado pelas condições de incubação: temperatura mais alta e força iônica mais baixa requerem maior precisão no pareamento, que resulta na formação de uma molécula dupla mais estável (Britten e Kohne, 1968; Rice e Paul, 1972). Nas reações entre DNAs de espécies diferentes, quando se pretende estudar homologias entre famílias de DNA reiterado, há maior discriminação em temperaturas mais elevadas (Martin e Hoyer, 1966).

A complexidade das famílias de DNA reiterado pode ser avaliada a partir da sua velocidade de reassociação. A complexidade cinética é uma medida operacional que pode ser obtida por comparação com a renaturação de um DNA padrão, como o de *E. coli*, com tamanho de genoma bem estabelecido (Cairns, 1963) e fornece uma medida do comprimento da sequência que foi originalmente replicada para formar a família de DNA reiterado. Entretanto, há uma certa imprecisão na interpretação da complexidade cinética de uma família de DNA reiterado, em virtude do efeito do grau de semelhança entre os membros componentes, sobre a velocidade de reassociação. Britten e Bonner (1971) verificaram que o pareamento imperfeito, devido a presença de bases não complementares, reduz a velocidade de reassociação, podendo afetar significativamente a interpretação de medidas de frequência de repetição ou grau de homologia entre espécies. Estudos paralelos de Southern (1970) e Sutton e McCallum (1971), demonstraram igualmente, que a velocidade de reassociação de sequências semelhantes, mas não idênticas, fornece uma medida superestimada do comprimento real da uni-

dade de repetição.

Na maioria dos eucariotos estudados, pode-se distinguir duas classes de DNA reiterado (Britten e Kohne, 1968): DNA altamente repetido ou de "sequência-simples" (Walker, 1971) e DNA de repetição "média" ou "intermediária".

Os DNAs satélites são, provavelmente, os melhores exemplos de famílias de sequências de nucleotídeos altamente repetidos. O satélite de camundongo foi descrito em 1961 por Kit (1961) e Szybalski (citado em Walker, 1971), independentemente, como um componente menor, que se separa da banda principal do DNA em gradientes de cloreto de cério, em virtude de diferenças no conteúdo de GC. É encontrado em todos os tecidos, inclusive em células em cultura de tecido de várias linhagens de camundongo (Kit, 1961), representando 10% do genoma. Renatura com velocidade muito grande (Waring e Britten, 1966) e a curva de renaturação se superpõe à uma curva ideal de segunda ordem, com uma inclinação que indica ausência de heterogeneidade interna. O DNA satélite nativo apresenta uma banda unimodal e estreita em gradientes de CsCl, indicando que ocorre em longos segmentos de DNA, cada um contendo um grande número de elementos repetidos semelhantes (Walker, 1971). Baseados na relação linear entre o inverso do tamanho do genoma e a velocidade de reassociação, Waring e Britten (1966), propuseram que o satélite deveria ser constituído por cerca de 10^6 cópias extremamente semelhantes de um segmento de aproximadamente 300 nucleotídeos de comprimento. Por outro lado, Southern (citado em Britten, 1971), através da análise parcial da sequência de bases, sugeriu que o satélite de camundongo poderia ser formado por uma unidade de repetição muito pequena, da ordem de 10 a 12 nucleotídeos, extremamente modificada ao longo da evolução. Britten (1971), analisando os dados obtidos por Southern, concluiu que se a repetição interna de um fragmento curto realmente existiu, ela não é mais detectável cineticamente, podendo evidenciar-se apenas a repetição principal do DNA satélite. Todavia, a interpretação desses resultados torna-se cada vez mais difícil, levando-se em consideração a descoberta de outros satélites em mamíferos

(Southern, 1970) e Drosophila (Peacock et al., 1973 ; Gall et al., 1973) que, segundo a análise da estrutura primária e ação de enzimas de restrição (Southern e Roizes, 1973), parecem ser constituídos pela repetição de segmentos contendo 5 a 7 nucleotídeos. Portanto, a sequência original dos DNAs satélites parece ser muito pequena, mas a introdução de mutações nessa sequência, faz com que ela se comporte, durante a reassociação, como se fosse muito mais longa.

O DNA satélite de vários eucariotos parece estar sempre associado à fração heterocromática (Yasmin e Yunes, 1970). O emprego da técnica de hibridização de ácidos nucleicos "in situ" (Jones, 1970; Pardue e Gall, 1969), permitiu demonstrar DNA altamente repetido associado aos centrômeros de cromossomos metafásicos, nucléolos e grânulos de cromatina de núcleos interfásicos. As sequências satélites são geralmente encontradas nas regiões heterocromáticas dos cromossomos, com exceção do cromossomo Y de camundongo (Pardue e Gall, 1970) e de algumas espécies de Drosophila (Hennig, 1972). Rudkin (1969) demonstrou que, durante a formação de núcleos politênicos, há uma sub-replicação da heterocromatina em relação à replicação de regiões eucromáticas. Consequentemente, o DNA satélite não é replicado durante a formação dos cromossomos politênicos, ou, pelo menos, não é replicado proporcionalmente ao resto do genoma (Gall et al., 1973). Em células de camundongo, com divisão sincronizada, o satélite é sintetizado na fase S tardia, enquanto que as frações do genoma ricas em GC, são replicadas logo no início. Esses dados concordam com a localização heterocromática das sequências satélites, já que a heterocromatina é replicada tardiamente durante a fase S (Walker, 1971).

A simplicidade de sequência dos DNAs satélites, sugere que eles não possam funcionar como genes estruturais, apesar de Skinner e Kerr (1971) terem proposto que o satélite AT de caranguejo fosse o responsável pela síntese de uma proteína específica. O satélite de camundongo não é transcrito (Flamm et al., 1969) e a análise da sequência de bases do satélite α de co-

baia (Southern, 1970), mostra que vários dos possíveis codons são "non-sense", tornando pouco provável que essas sequências sejam traduzidas em proteína.

Em vários organismos superiores, existe uma fração do DNA altamente reiterado que mimetiza o comportamento de moléculas bicatenárias, após incubação em condições que não permitem reassociação por colisão bimolecular (Davidson et al., 1973). Esse tipo de DNA com renaturação "instantânea" (ou "espontânea"), possui metade de suas bases pareadas e encontra-se distribuído ao longo do genoma, mostrando uma certa dependência na composição de bases das regiões adjacentes (Bonner, 1973). Existem evidências de que se relacionem topograficamente com DNA reiterado, pois ocorrem com alta frequência no satélite de camundongo (Flamm et al., 1969). A renaturação espontânea poderia resultar da existência de "cross-linking" (Alberts e Doty, 1968; Mulder e Doty, 1968) ou de sequências parcialmente complementares ao longo da mesma fita de DNA (Flamm et al., 1969; Britten e Smith, 1970; Bonner, 1973).

O segundo tipo de DNA reiterado encontrado nos eucariotos, é definido por critérios cinéticos e, exceto alguns casos especiais (Corneo et al., 1970), só pode ser isolado como uma fração de DNA reassociado. Essa fração renatura mais lentamente que as sequências satélites, mas mais depressa que sequências que ocorrem uma ou poucas vezes no genoma. O DNA de "repetição intermediária" (ou DNA "intermediário"), contém as sequências que hibridizam com RNA em experimentos que empregam baixa concentração de ácidos nucleicos. De fato, as experiências de hibridização realizadas inicialmente, devido às condições de incubação empregadas, mediam somente a homologia entre sequências de RNA e sequências de DNA repetido (Melli e Bishop, 1969; Britten, 1970).

As sequências com reiteração intermediária, ao contrário das sequências satélites, parecem estar dispersas ao longo do genoma (Britten e Smith, 1970), em regiões de eucromatina e heterocromatina (Pardue e Gall, 1969; John et al., 1969, Jones e Robertson, 1970; Hennig

et al., 1970), sendo representadas em tecidos politênicos (Gall et al., 1971). Os cistrons para rRNA e tRNA pertencem à fração de DNA "intermediário".

O número de cistrons ribossômicos aumenta ao longo da escala evolutiva, paralelamente ao aumento do genoma dos organismos. Valores máximos de multiplicidade são encontrados em ovócitos de insetos e anfíbios, como consequência de processos de amplificação gênica (Birnstiel et al., 1971). Os trabalhos iniciais com Xenopus (Brown e Gurdon, 1964) e Drosophila (Ritossa e Spiegelman, 1965), serviram de suporte para a identificação do organizador do nucléolo como o locus para os cistrons ribossômicos redundantes (Gambarini, 1972), posteriormente confirmada por hibridização "in situ" (Pardue et al., 1970). Como os cistrons de rRNA em eucariotos são intensamente agrupados e, geralmente, possuem alto teor de GC, podem aparecer como satélites em gradientes de CsCl, facilitando o seu isolamento. Em bactérias, a obtenção de rDNA é dificultada pela presença de sequências espaçadoras com composição de bases mediana. Entretanto, Kohne (1969) e Colli e Oishi (1970), conseguiram o isolamento de rDNA de E. coli e Bacillus subtilis respectivamente.

Na maioria dos eucariotos estudados, os cistrons para rRNA 18S e 28S, são intercalados por sequências reiteradas com alto teor de GC, denominadas sequências espaçadoras (Birnstiel et al., 1968; Brown e Weber, 1968). O rDNA contém, adicionalmente, uma fração que é transcrita e posteriormente perdida, durante o processamento do rRNA (Loening et al., 1969). As sequências espaçadoras não são transcritas (Hallberg e Brown, 1969) e sua função é desconhecida.

Os genes que codificam para RNA ribossômico 5S e RNA de transferência também são reiterados e intercalados por sequências espaçadoras (Birnstiel et al., 1971). Ao contrário dos cistrons de rRNA 18S e 28S, não estão confinados ao organizador do nucléolo (Wimber e Steffensen, 1970; Steffensen e Wimber, 1971; Pardue et al., 1973).

A transcrição de DNA reiterado foi demonstrada em outros casos, onde as sequências repetidas estavam representadas em RNA estritamente nuclear (Melli e Bishop, 1969, 1970; Melli et al., 1971; Balsamo et al., 1973) e em RNA mensageiro de histonas (Kedes e Birnstiel, 1971).

A cinética de renaturação em diferentes eucariotos demonstra que, em todas as espécies estudadas, há uma fração considerável de DNA "único" que contém, provavelmente, a maior parte dos genes estruturais. Modificações da técnica de hibridização RNA-DNA, permitem estudar a expressão de sequências "únicas" de DNA (Melli et al., 1971; Gelderman et al., 1972; Firtel et al., 1972). Estudos recentes de Paul et al. (1973), Bishop e Freeman (1973) e Crippa et al. (1973), indicam que os loci responsáveis pela transcrição de mRNAs bem caracterizados (mRNA de hemoglobina de pato e camundongo e mRNA de polissomos de nêurula de Xenopus), pertencem à fração de DNA "único". Além disso, os resultados sugerem que esses RNAs mensageiros possuem, na extremidade 5', sequências reiteradas, transcritas do DNA intermediário, além do segmento de poli-A na extremidade 3'.

As experiências de renaturação de DNA de organismos superiores, empregando fragmentos de diferentes tamanhos, indicam conclusões gerais sobre o arranjo das sequências: ao longo da maior parte do genoma, as sequências únicas se alternam com as sequências repetidas (Davidson et al., 1973; Graham et al., 1973).

Atualmente, a hipótese mais aceita sobre a organização do DNA cromossômico de eucariotos, propõe que cada cromossomo contenha uma única molécula bicatenária de DNA (cf. Swift, 1973). Os cromômeros, identificados com as bandas dos cromossomos politênicos, são considerados como as menores unidades estruturais. Várias evidências sugerem que somente uma função genética seja associada a cada banda que, porém, contém muito mais DNA que o necessário para codificar uma molécula

la de proteína de tamanho médio. Realmente, o núcleo de muitos organismos superiores parece conter DNA que, aparentemente, não é funcional. Em Drosophila, uma fração razoável do cromômero parece não ser essencial para o desenvolvimento de um caráter fenotípico (Sorsa et al., 1973).

Thomas (1970) sugere que a estrutura do cromômero e o problema do excesso de DNA poderiam ser explicados se se postulasse que os cromômeros fôsem constituídos por famílias de repetições idênticas enfileiradas, conforme originalmente proposto por Callan (1967). O suporte experimental para essa hipótese, originou-se de trabalhos de Thomas et al. (1970), que observaram ao microscópio eletrônico, a formação de círculos estáveis após tratamento de DNA nativo com exonuclease, ou depois da renaturação de DNA desnaturado. A formação de círculos seria consequência da existência de sequências idênticas ao longo da molécula de DNA. Posteriormente, Thomas et al. (1973), confirmaram a homologia existente entre essas sequências, através da verificação da grande estabilidade térmica da região dupla que determina a formação do círculo. Portanto, segundo essa hipótese, cada locus gênico dos eucariotos ocorreria como uma série linear de sequências idênticas. Essa teoria contraria a existência, cada vez mais comprovada, de sequências "únicas" no DNA de eucariotos. Provavelmente, a formação de círculos é devida às sequências com repetição grande ou intermediária, intercaladas entre as sequências únicas. A produção de círculos não deve ser considerada como evidência para a existência de uma estrutura básica de repetições em todos os cromômeros de um cromossomo. Em alguns casos especiais, como os loci que codificam para histona, podem ocorrer regiões de genes estruturais repetidos, conforme proposto por Thomas (1970).

Apesar da quantidade de informações acumuladas sobre a estrutura e distribuição das sequências reiteradas, nada se sabe sobre o mecanismo molecular que poderia criar esse tipo de sequência, nem sobre sua

possível função biológica. Segundo Walker (1971), a presença de sequências repetidas proporcionaria uma certa vantagem seletiva aos cromossomos, porque há evidências que, durante a meiose, o comportamento dos cromossomos seja afetado pela natureza e quantidade da heterocromatina adjacente aos centrômeros. Todavia, atualmente, procura-se atribuir um papel de regulação ao DNA reiterado.

A maioria dos modelos propostos para a organização dos cromossomos de eucariotos enfatiza a necessidade de sítios de controle adjacentes aos genes estruturais, tendo em vista a "interdispersão" de DNA "único" e repetido. Os sítios de controle seriam constituídos por sequências reiteradas.

Trabalhos de difração de raios X demonstram que a estrutura secundária do DNA varia com a composição de bases: DNA muito rico em AT parece não adotar a configuração B, característica para DNA com teor baixo ou moderado de AT (Bram, 1971). Em Drosophila, satélites com razões de bases diferentes, são sub-replicados diferencialmente durante a politenização. Como a estrutura secundária do DNA é uma função da sua composição de bases, postula-se que os satélites e outras sequências repetidas apresentariam conformações diferentes que permitiriam o reconhecimento por proteínas reguladoras e a não replicação de segmentos específicos do genoma (Blumenfeld e Forrest, 1972).

Britten e Davidson (1969) e Georgiev (1969) sugerem que o DNA intermediário seja responsável pela regulação da diferenciação. Os primeiros supõem que moléculas de RNA exclusivamente nuclear seriam o produto de genes reguladores que não seriam traduzidos. No modelo de Georgiev, o RNA nuclear de alto peso molecular conteria a informação para a síntese de proteínas reguladoras, semelhantes aos repressores bacterianos. A demonstração da transcrição de sequências intermediárias em moléculas de RNA exclusivamente nuclear e o comprimento das sequências únicas e repetidas intercaladas, são consistentes com o modelo de Britten e Davidson (1969). Crick (1971), baseado na hipótese formulada por esses autores,

elabora um modelo que distingue duas classes de DNA: DNA globular, com função de controle e uma fração menor de DNA fibroso, que codificaria a síntese de proteínas. Os sítios de controle conteriam regiões não pareadas, provavelmente de poli A, que poderiam reagir com outras regiões semelhantes pertencentes a uma banda da mesma cromátide. Essa situação deveria ser encontrada nas sequências satélites altamente repetidas da heterocromatina próxima aos centrômeros. Esses sítios seriam os mediadores do alinhamento das bandas dos cromossomos politênicos. Segundo Paul (1972), regiões de nucleoproteína densamente enovelada (correspondentes ao DNA "globular" de Crick, 1971) se alternariam com regiões de nucleoproteína menos compacta. Proteínas não histônicas se ligariam a sítios múltiplos no DNA ("address sites") e causariam um desdobramento parcial da nucleoproteína, possibilitando a ligação de RNA polimerase a sítios promotores adjacentes. Os "address sites" seriam formados pelas sequências repetidas.

A análise da reassociação das sequências de nucleotídeos encontradas nos roedores (Flamm et al., 1969; Hennig e Walker, 1970; Rice, 1971a,b; Rice e Straus, 1972) e em outros grupos de animais (Britten e Kohne, 1967; Britten e Smith, 1971) e plantas superiores (Bolton, 1966) permite definir afinidades taxonômicas através da homologia genética ao nível molecular e estabelecer possíveis relações evolutivas. Uma fração do DNA intermediário dos eucariotos é comum a espécies relacionadas e produz moléculas duplas homólogas ou heterólogas com baixa estabilidade térmica, sugerindo um certo grau de divergência entre as sequências repetidas.

O rDNA constitui um grupo muito especial de sequências com repetição intermediária. Ao contrário do resto do genoma, os cistrons ribossômicos de bactérias e eucariotos hibridizam com DNA heterólogo, formando moléculas duplas perfeitamente pareadas (Birnstiel et al., 1971). Enquanto essas sequências foram extremamente conservadas ao longo da evolução, o DNA espaçador, não transcrito, mostra grande divergência, mesmo em espécies do mesmo gênero, como no caso de Xenopus laevis e mulleri (Brown et al., 1972).

A constância das sequências ribossômicas contrasta com a grande variabilidade dos satélites , que parecem ser específicos para cada espécie (Flamm et al., 1969; Hennig e Walker, 1970; Britten e Smith , 1971; Rice e Straus, 1972). Satélites do grupo de Drosophila virilis (Gall et al., 1973), ao contrário do satélite de camundongo e do satélite α de cobaia, são muito homogêneos. Os satélites mais recentes originaram-se por uma única substituição de base em cada sequência repetida. No caso dos satélites, a seleção não poderia ser responsável pela conservação, já que essas sequências não são, aparentemente, transcritas ou traduzidas. Atualmente, propõem-se mecanismos para a manutenção da homogeneidade dessas sequências, os quais impediriam o acúmulo de mutações e também explicariam a introdução de mudanças regulares de bases, conforme verificado nos satélites de algumas espécies de Drosophila (Gall et al., 1973).

A formação das famílias de DNA reiterado é explicada por dois mecanismos. Southern (1970), sugere que a estrutura atual do satélite α de cobaia poderia ser resultante de duplicações sucessivas de uma sequência ancestral e introdução posterior de mutações. Os satélites do grupo virilis exemplificam o tipo de sequência postulada como precursora dos satélites de camundongo e de cobaia.

A ocorrência escassa de DNA com baixa frequência de reiteração sugeriu a Britten e Kohne (1968) que a duplicação ao acaso não poderia produzir o padrão de frequências de repetição encontrado nos eucariotos. Aparentemente, certas sequências seriam favorecidas pela duplicação que ocorreria através de "replicação saltatória". Segundo esse mecanismo, uma sequência original de DNA seria, subitamente, ao longo da evolução, replicada muitas vezes, formando uma família de sequências idênticas. Os membros dessa família sofreriam mutações e translocações para outros segmentos do cromossomo ou para outros cromossomos, originando uma família de sequências semelhantes, mas não idênticas. Posterior divergência faria com que não fosse mais possível detectar homologia entre essas sequências que seriam indistinguíveis da

sequência original de DNA. O processo de formação de uma família seria muito rápido em relação à velocidade de mutação. A idade de uma família pode ser estimada através da divergência entre seus membros. Segundo o modelo da replicação saltatória, novas famílias estariam constantemente surgindo ao longo da evolução. Famílias originadas recentemente, como os satélites, seriam limitadas somente a uma espécie e seus membros seriam praticamente iguais. Uma família formada há muito tempo, seria encontrada atualmente em espécies distantes e haveria grande divergência entre seus membros. A razão entre a quantidade de DNA não homólogo entre duas espécies e o tempo desde a divergência dessas espécies, fornece uma medida da velocidade de introdução de novas famílias de DNA repetido no genoma. Essa velocidade se refere somente às famílias que foram fixadas no genoma da espécie e não deve ser interpretada como a velocidade de crescimento do genoma, porque muitas famílias podem não ter sido fixadas e nada se sabe sobre a velocidade de perda de DNA durante a evolução de uma espécie. Outros mecanismos para crescimento do genoma como poliploidia ou politenia, tenderiam a aumentar a contribuição devida a eventos saltatórios (Kohne, 1971).

A reassociação de DNA pode, portanto, ser utilizada para estudar o grau de divergência evolutiva entre vários sistemas biológicos, permitindo estabelecer uma correlação com os dados paleontológicos. Os resultados sugerem que, durante o processo de replicação, ocorrem alterações genéticas ("replicação saltatória") com velocidade suficientemente grande para serem detectadas contra um "background" contínuo de mudanças que envolvem um único par de bases (Kohne et al., 1971).

A análise da sequência de aminoácidos de proteínas homólogas de espécies diferentes, permite avaliar a velocidade de substituição de aminoácidos. A comparação entre a velocidade de evolução de proteínas e DNA (Laird et al., 1969) fornece resultados de difícil interpretação, porque não se conhece a fração do DNA de organismos superiores que codifica para proteí-

na. Grande parte do DNA analisado pode não ter expressão genética e, conseqüentemente, não ter sido conservado. Por outro lado, as proteínas estudadas geralmente têm funções celulares específicas, ou seja, são geneticamente importantes e aptas a serem conservadas (Kohne et al., 1971).

3. Caracterização do genoma de A. castellanii

O princípio biológico da continuidade germinal exclui a possibilidade de que a diferenciação envolva distribuição diferencial de DNA entre tecidos ou células em diferentes estágios de diferenciação. Aplicações de técnicas de hibridização RNA-DNA, permitem isolar as sequências de DNA expressas em RNA. O conhecimento da fração de DNA expresso tem sido utilizado para detectar amplificação gênica em tecidos adultos ou fetais (Kohne e Byers, 1971) e os resultados obtidos excluem a existência de amplificação, pelo menos, em larga escala. Além disso, a análise da atividade gênica ao longo da ontogênese demonstra que todas as sequências de DNA estão igualmente representadas em todos tecidos adultos, embrionários e transformados de mamíferos (Bolton, 1966). Por outro lado, a população de moléculas de RNA de diferentes órgãos adultos e fetais diferem na qualidade e na quantidade. À medida que ocorre a diferenciação de larvas de Xenopus, verifica-se que o RNA produzido cada vez mais se assemelha ao RNA da larva totalmente desenvolvida (Bolton, 1966). Esses resultados corroboram a idéia fundamental de que a diferenciação implica na atividade diferencial do genoma, através da produção de populações distintas de moléculas de RNA (Jacob e Monod, 1963). Todavia, em certos organismos como Rhyncosciara e Sciara, há evidências de replicação diferencial do genoma (Breuer e Pavan, 1955; Crouse e Keyl, 1968; Meneghini et al., 1971). A partir dessas evidências, formulou-se a hipótese de que a alteração do potencial genético dos seres vivos, facilmente detectada

em alguns organismos, poderia constituir um mecanismo genérico de citodiferenciação (Pavan, 1965). Entretanto, a amplificação gênica, como mecanismo do desenvolvimento, talvez seja restrita a situações onde grande quantidade de um produto gênico específico seja necessária, como na ovogênese de anfíbios (Birnstiel et al., 1971) e insetos (Gall et al., 1969; Lima-de-Faria, 1973), ou na "magnificação" de rDNA em mutantes "bobbed" de Drosophila (Ritossa, 1972). Entretanto, a descrição de mecanismos sofisticados de citodiferenciação mostra que as generalizações devem ser analisadas criticamente. Em certos organismos, verifica-se eliminação seletiva de cromatina (cf. Balsamo, 1972) ou de DNA altamente repetido, como acontece em Ascaris (Modak, 1973). Durante a formação do macronúcleo de ciliados (Prescott e Krishna Murti, 1973), há destruição de 80% do DNA e as novas moléculas são sintetizadas a partir de pequenos fragmentos restantes de DNA, que contém todas as informações necessárias para a manutenção, crescimento e divisão das células.

Trabalhos antigos sobre a diferenciação de A. castellanii (Volkonsky, 1931), mostraram que, logo no início do encistamento, havia uma expulsão parcial de cromatina periférica para o citoplasma adjacente ao núcleo. O material foi caracterizado como DNA, devido à reação de Feulgen positiva. Em vistos mais velhos, essa zona desaparecia, devido à migração do ácido nucleico para a membrana externa do cisto. Observava-se, também, a saída de grânulos basófilos do nucléolo, que se acumulavam inicialmente no nucleoplasma próximo à membrana nuclear e depois migravam para o citoplasma, onde desapareciam gradativamente. Posteriormente, através de microscopia eletrônica, Bowers e Korn (1969) verificaram que o volume nuclear diminuía 40% durante o encistamento: no início do processo, o núcleo tornava-se lobado, formando pequenos botões que pareciam não conter material nucleolar. Grande parte dos botões era incorporada em autolisossomos, característicos de células encistantes. Além disso, parte do material densamente corado do nucléolo, parecia se dispersar no nucleoplasma e seu destino posterior era

difícil de ser determinado morfológicamente. O decréscimo nucleolar, igual a 75% durante o encistamento (Ray e Hayes, 1954), era paralelo à expulsão de cromatina.

Chang e Humes (1962) isolaram um fator transferível para células humanas em cultura de tecido, denominado "lipovírus". Trabalhos posteriores (Chang et al., 1966), sugeriram que o "lipovírus" era transportado por uma célula amebóide, capaz de transferi-lo para células humanas crescendo "in vitro", por um mecanismo desconhecido que exigia o contato entre as células. O fator transferível sofria replicação na célula hospedeira, causando alterações nucleares (degradação de DNA), produção de antígenos específicos e lise celular. A injeção intracerebral das células amebóides com seu fator transferível, em macacos, causava encefalite. As células amebóides foram, então, identificadas como Hartmannella rhysodes (Acanthamoeba sp.). A observação direta do efeito patológico dessas amebas e a demonstração, por imunofluorescência, de antígenos das amebas nas células hospedeiras (Liu e Rodina, 1966), sugeriram que Acanthamoeba transportava um fator transferível, de natureza desconhecida. Ito e colaboradores (1969) postularam que o fator transferível poderia ser o responsável por parte da incorporação citoplasmática de timidina tritiada verificada anteriormente (Chang et al., 1966). Análise estrutural fina, através de autoradiografia em trofozoitos de Acanthamoeba (Ito et al., 1969) demonstrou incorporação ativa de timidina tritiada no citoplasma, enquanto que a marcação nuclear era relativamente limitada: cerca de 32% da radioatividade era encontrada no citoplasma e o número de grãos contados sobre o plasmalema era três vezes maior do que sobre as mitocôndrias. A linhagem de Acanthamoeba utilizada por Ito et al. (1969), foi propagada durante anos em culturas axênicas, tornando, portanto, pouco provável que os corpúsculos citoplasmáticos resultassem da introdução de microrganismos exógenos. Em duas linhagens de Naegleria gruberi, ameba de solo relacionada taxonomicamente com A. castellanii, foi demonstrada a existência de partículas semelhantes a vírus ao microscópio

eletrônico, capazes de infectar células de embrião de galinha, ocasionando lise e liberação de maior quantidade de material infectante (Dunnebacke e Schuster, 1971). Em Acanthamoeba, os corpúsculos citoplasmáticos contendo DNA poderiam ser elementos genéticos normais do genoma da ameba, endosimbiontes facultativos ou parasitas intra-celulares como vírus defectivos ou episomos (Ito et al., 1969). A existência provável desses elementos se relaciona com a verificação anterior de um fator transferível nessa linhagem.

A descrição da expulsão de cromatina e a presença de endósimbiontes citoplasmáticos podem, de alguma maneira, estar relacionadas. Nos estágios iniciais do encistamento, verifica-se o aparecimento de autolisossomos no citoplasma, contendo mitocôndrias, grânulos de glicogênio etc. (Bowers e Korn, 1969). Os cistos apresentam agregados de restos citoplasmáticos aderidos à camada externa da parede do cisto, sugerindo que o conteúdo dos autolisossomos seja descarregado na parede em formação (cf. Bowers e Korn, 1969). Autólise e excreção de componentes citoplasmáticos e nucleares são consistentes com o aparecimento de proteínas, aminoácidos e ribonucleotídeos no meio de cultura de células encistantes (Griffiths e Hughes, 1968). O material excretado contém, ao microscópio eletrônico, partículas semelhantes a vírus (Bowers e Korn, 1969).

Fenômeno semelhante à liberação de cromatina em A. castellanii, foi verificado durante a ovogênese de insetos do gênero Acheta, conforme trabalhos recentes de Lima-de-Faria e colaboradores (cf. Lima-de-Faria, 1973). Durante a meiose, nesses organismos, há amplificação de certos cromômeros que liberam as cópias amplificadas no nucleoplasma. Subsequentemente, esse DNA se dirige para as proximidades do envelope nuclear e força sua passagem para o citoplasma, ficando envolvido por uma parte da membrana nuclear. Através de hibridização "in situ", demonstra-se que a maior parte do material amplificado é formado por cistrons ribossômicos. O DNA migra para o citoplasma acompanhado por grande quantidade de RNA. Os dois tipos de áci-

dos nucleicos permanecem associados no citoplasma, formando grandes partículas de função desconhecida. Essa transferência de complexos DNA-RNA também foi verificada em outras espécies de insetos (Jaworska, citado em Lima-de-Faria, 1973) e rato (Izquierdo e Vial, 1962; Szollosi, 1965, citados em Lima-de-Faria, 1973).

O encistamento em amebas pode ser considerado como um processo de diferenciação celular típica, não complicado por processos sexuais (Neff et al., 1964 a). Muitos sistemas biológicos têm sido explorados, na tentativa de elucidar os eventos metabólicos que determinam a regulação do crescimento e diferenciação celular. O encistamento pode constituir um sistema útil para o estudo da morfogênese celular, já que os tipos celulares envolvidos são distintos estrutural e quimicamente e o processo pode ser acompanhado sob condições experimentais bem definidas. Apesar de representar um exemplo de diferenciação de protozoários, pode servir como um modelo simples para a compreensão do desenvolvimento de sistemas evolutivos mais complexos, com os quais compartilha características comuns (Krishna Murti, 1971; Stevens e Pachler, 1973 a).

Assim, a simplicidade relativa do sistema de A. castellanii, a facilidade de ser cultivada axenicamente em larga escala e a possibilidade de ser encistada sincronicamente, motivaram o estudo da diferenciação dessa ameba. Tendo em vista as mudanças nucleares paralelas ao encistamento, a idéia inicial deste trabalho era analisar o padrão de sequências de DNA nas duas fases do ciclo de vida do protozoário. O objetivo era explorar as interações entre os ácidos nucleicos do cisto e trofozoito, através da homologia entre seus DNAs. Especulações como essas poderiam fornecer resultados interessantes sobre o papel biológico das diferentes famílias de DNA presentes nos organismos superiores, já que a diferenciação da ameba envolve, provavelmente, perda de parte do material genético. A caracterização do DNA de trofozoito sugeriu vários problemas que passaram, então, a ser estudados. Padronizou-se um método de isolamento de núcleos dessa ameba (Marzzoco e Colli, 1974)

e de extração de DNA de trofozoitos e cistos. A análise do DNA de trofozoitos quanto ao comportamento em gradientes de densidade, perfil de desnaturação e renaturação, forneceu resultados que podem se relacionar com a descrição citológica de corpúsculos citoplasmáticos contendo DNA (Ito et al., 1969) e com a extrusão de DNA para o citoplasma (Bowers e Korn, 1969). Deste modo, o trabalho a ser descrito representa a caracterização parcial do DNA de trofozoito e uma análise preliminar do DNA de cisto. Os resultados obtidos poderão, futuramente, servir para o estudo da homologia existente entre esses ácidos nucleicos, o que poderia ser útil para uma melhor compreensão da diversificação gênica durante o ciclo de vida de um organismo superior relativamente simples.

V. Métodos

1. Crescimento de *A. castellanii*

a) Meios de crescimento

O crescimento da ameba foi testado em dois meios de cultura, resultantes de modificações dos meios descritos por Neff (1957) e Band (1959). A composição dos meios empregados, denominados A e B era a seguinte:

Meio A	Meio B
proteose-peptona - 0,75%	proteose-peptona - 1,5%
extrato de levedo - 0,75%	glicose - 1,0%
glicose - 1,5%	NaCl - 2mM
MgSO ₄ - 1mM	MgCl ₂ - 0,015mM
CaCl ₂ - 0,05mM	CaCl ₂ - 0,02mM
KH ₂ PO ₄ - 2mM	FeSO ₄ - 0,01mM
citrato férrico - 0,1mM	Na ₂ HPO ₄ - 1mM
	KH ₂ PO ₄ - 1mM

Os dois meios continham ainda, as seguintes vitaminas: tiamina (1mg/l), biotina (0,2mg/l) e vitamina B₁₂ (1 µg/l).

A preparação dos meios de cultura seguia o procedimento descrito abaixo, necessário para evitar a formação de resíduos insolúveis, ricos em nitrogênio, após a autoclavagem.

O meio, com pH igual a 7,0, não contendo glicose e vitaminas, era fervido durante 20 minutos. Após resfriamento, as vitaminas eram adicionadas e o meio filtrado através de papel de filtro fino. O líquido transparente resultante era distribuído em frascos de cultura e autoclavado a 120°C, 1kg/cm², durante 30 minutos. Antes do inóculo, glicose 50%, autoclavada à parte, era

adicionada assêpticamente, no volume adequado. Em alguns casos, adicionava-se 100 µg/ml de penicilina e estreptomicina, previamente esterilizadas por passagem em filtros Millipore GS autoclavados.

b) Tratamento dos frascos de cultura

As amebas aderem firmemente a superfícies, o que dificulta a obtenção de dados quantitativos sobre o crescimento. O uso de vidraria tratada com silicone evita esse problema, sem causar nenhum dano às células (Neff et al., 1958). Os frascos de cultura, limpos e secos, eram siliconizados com uma solução 5% de silicone e secos a 220°C por cerca de 16 horas.

c) Métodos de cultura

A cultura era sempre feita a 28°C, de diversas maneiras:

Culturas estacionárias: as amebas eram crescidas em culturas rasas, obtidas com erlenmeyers - contendo um volume de meio igual a 1/5 da capacidade do frasco. Esse tipo de cultivo era utilizado para manutenção de culturas-estoque.

Culturas agitadas: amebas cultivadas em erlenmeyers, mantendo a mesma relação de volume (5:1), eram incubadas em agitadores New Brunswick, com velocidade em torno de 100 rpm. O crescimento em pequena escala, podia ser obtido por incubação de pequeno volume de meio (cerca de 2 ml), em tubos inclinados sob agitação.

Cultura em larga escala: para a obtenção de grandes quantidades de células, adotaram-se diferentes processos de cultivo: crescimento em frascos de 12 l, contendo 1 l de meio, incubados estaticamente; crescimento segundo Adam et al. (1969), onde a aeração era obtida colocando-se frascos de 3 a 6 l, contendo imã, sobre agitadores magnéticos e cultivo em fermenta-

dor (New Brunswick Sci. Co. Inc.), com uma dorna de 8 l, contendo 5 l de meio, aeração de 2 l de ar por minuto e agitação de 80 rpm.

d) Determinação da velocidade de crescimento

O crescimento era medido pelo número de células por ml de meio, por tempo de cultivo. O número de células era determinado por contagem de amostras triplicatas em câmara tipo Neubauer (Resistance, Germ). Alternativamente, o crescimento era determinado pela absorbância a 600 nm, em um espectrofotômetro Coleman Jr. II, utilizando-se frascos de cultura com um tubo de ensaio adaptado lateralmente.

e) Manipulação de culturas

As operações, após autoclavagem dos frascos, eram realizadas em câmara asséptica. O controle de contaminação das culturas era realizado por pré-incubação dos frascos estéreis a 37°C, 16 horas; verificação de crescimento bacteriano por adição de alíquotas do meio de crescimento em caldo glicosado, incubado a 37°C por 16 horas e coloração do meio de crescimento estéril pelo método de Gram.

2. Encistamento

O encistamento era induzido por remoção das células do meio de crescimento, lavagem e transferência para um meio de encistamento semelhante ao descrito por Neff et al. (1964 b), com a seguinte composição: KCl 100 mM; MgSO₄ 8mM; CaCl₂ 0,4mM; NaHCO₃ 1mM e tampão Tris-HCl 20 mM, pH 9,0. O meio de encistamento era autoclavado nas mesmas condições que o meio de crescimento e todas operações eram realizadas assépticamente. Células de culturas agitadas em fase logarítmica tardia, eram coletadas por centrifugação (800xg,

10 min.) e lavadas três vezes com meio de encistamento. Em seguida, as células eram suspensas em meio de encistamento, ao nível de 10^5 células/ml e incubadas a 28°C sob agitação, durante 20 horas. A relação entre capacidade do frasco e volume de meio era igual a 5:1. Os cistos, suspensos em meio de encistamento, eram estocados a 4°C .

Encistamento espontâneo podia ser obtido em culturas agitadas que, após atingirem uma densidade de aproximadamente 1×10^6 células/ml, começavam a encistar assincronicamente.

3. Germinação (Excistamento)

Os cistos eram centrifugados e lavados três vezes com meio de crescimento ($1000 \times g$, 10 min.); sob condições assépticas. Os cistos lavados, eram, então, inoculados ao nível de 5×10^3 organismos/ml, em meio de crescimento, e cultivados sob agitação a 28°C . A germinação era acompanhada durante 8 horas, retirando-se alíquotas (intervalos de 30 min), que eram observadas ao microscópio de fase para verificação do aparecimento de amebas livres no meio.

4. Isolamento de núcleos de trofozoítos

Vários métodos para purificação de núcleos, utilizando meios aquosos de homogenização, foram testados. Segue-se uma descrição sucinta de cada método:

a) Método de Chauveau et al. (1956): o procedimento adotado era semelhante ao descrito originalmente para fígado de rato.

b) Método que emprega o detergente Nonidet P-40: as células eram sedimentadas e lavadas com sacarose 0,25M; CaCl_2 3 mM e Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4. Em seguida, as células eram suspensas na mesma solução contendo detergente e agitadas em agitador magnético por 10 a 30 minutos a 4°C . Foram testadas várias concentra-

ções do detergente, variando de 0,5 a 5,0%.

c) Método de Stevenson (1967), modificado: a lise celular era obtida por suspensão das células em meios hipotônicos (NaCl 0,05 M, CaCl_2 1 mM), contendo 0,1% (v/v) de Tween 80.

d) Homogenização de células em um aparelho Virtis, modelo 45: Foram testados diferentes meios de homogenização, contendo ou não detergentes e vários tempos e velocidades de agitação.

e) Rompimento de células por ultra-som: células lavadas e suspensas em sacarose 0,25 M, contendo CaCl_2 3 mM e Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, eram submetidas a diferentes tempos e intensidades de sonicação em um aparelho modelo W185D da Heat-Systems Ultrasonics, Inc.

f) Método de Schneider e Hogeboom (1950), modificado: cerca de 3×10^8 células eram centrifugadas (800 xg, 10 min.) e lavadas com sacarose 0,25 M; MgCl_2 1mM, suspensas em 0,5 ml de sacarose 0,88 M; MgCl_2 1mM e forçadas através de uma agulha hipodérmica 25-8, por 20 vezes. O precipitado obtido por centrifugação do homogenato a 800xg, durante 10 minutos, era lavado duas vezes com a sacarose mais concentrada e suspenso em 1 ml da mesma solução. A fração nuclear impura era colocada sobre 10 ml de sacarose 2,4 M, contendo MgCl_2 1mM e centrifugada a 28000 rpm no rotor 50 Ti da ultracentrífuga Spinco, durante 1 hora.

g) Método de Hymer e Kuff (1966), modificado: a modificação introduzida refere-se à homogenização que era obtida por passagem em agulha hipodérmica 25-8, em vez de empregar um homogenizador tipo Potter-Elvehjem.

h) Método de Blobel e Potter (1966), modificado: o precipitado de núcleos impuros era obtido pelo método (f). A purificação posterior dos núcleos era feita conforme descrito por Blobel e Potter (1966).

i) Método de Rozijn e Tonino (1964): o método foi testado sem nenhuma modificação considerável.

j) Método adotado rotineiramente (Marzzoco e Colli, 1974):

Os núcleos eram sempre isolados de células em crescimento exponencial. Todas as etapas do iso-

lamente eram realizadas entre 0 e 4°C.

Cerca de 3×10^8 células eram coletadas por centrifugação (800xg, 10 min.) e lavadas com NaCl 0,14 M. Em seguida, determinava-se o peso úmido de células. As células eram suspensas em 1 ml de uma solução (meio PVP), com a seguinte composição: polivinilpirrolidona 8%; $MgCl_2$ 1mM; $CaCl_2$ 2mM; KCl 2 mM e Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4.

As células eram rompidas por passagem em seringa com agulha hipodérmica nº 25-8, por 15 a 20 vezes. O homogenato era diluído com meio PVP contendo sacarose 0,6 M, até concentração final de 25% (peso úmido inicial/volume). O homogenato diluído era centrifugado a 700xg por 10 minutos. O precipitado obtido era suspenso em um volume conhecido de meio PVP-sacarose 0,6 M.

A purificação dos núcleos era obtida por centrifugação em gradientes descontínuos de meio PVP, contendo diferentes concentrações de sacarose. Os gradientes tinham a seguinte composição do topo ao fundo: 0,3 ml de sacarose 1,2 M; 0,7 ml de sacarose 1,5M; 0,7 ml de sacarose 1,8 M e 2,1 ml de sacarose 2,0 M. A amostra (0,7 ml), contendo os núcleos era cuidadosamente colocada no topo do gradiente e centrifugada no rotor SW 65-Ti da ultracentrífuga Spinco L3, a 50000xg, por 1 hora a 4°C. Para volumes maiores, utilizava-se o rotor SW 25.1, mantendo as mesmas proporções relativas de soluções de sacarose. Depois da centrifugação, o material se distribuía em três bandas sobrenadantes constituídas por fragmentos de membranas de tamanho variado e um precipitado que continha os núcleos.

Os núcleos eram suspensos em meio PVP-sacarose 0,6 M, centrifugados a 700xg por 10 minutos e finalmente ressuspensos na mesma solução.

5. Controle da pureza das preparações de núcleos

a) Microscopia de fase: os núcleos isolados eram rotineiramente analisados, ao microscópio de fase,

quanto à sua integridade morfológica e ausência de células inteiras ou fragmentos de membranas contaminantes. O número de núcleos e células inteiras era determinado por contagem em câmara de Neubauer. Para isso, as preparações eram coradas com uma solução de Giemsa 10% em sacarose 0,25 M; MgCl_2 1 mM.

b) Microscopia eletrônica: os precipitados de núcleos eram fixados, durante 48 horas, em glutaral - deído 1,5%, em tampão fosfato de sódio 0,22 M, pH 7,2 . Os fragmentos eram, então, transferidos para uma solução de OsO_4 1% e, em seguida para uma solução de acetato de uranila 0,5%, onde permaneciam por 3 e 12 horas respectivamente. A desidratação era conduzida através de uma série gradativa de soluções de etanol. Os núcleos fixados e desidratados eram embebidos em Araldite e cortados em um ultra-micrótomo Porter-Blum MT-1. As secções obtidas, com cerca de 90 nm de espessura, eram coradas em acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 2,6% e examinadas em um microscópio eletrônico Zeiss EM9 S-2.

6. Dosagem de RNA, DNA e proteína em núcleos e homogenato.

A composição química de núcleos e homogenatos, era analisada através do método de Schmidt-Thannhauer, conforme descrito por Munro e Fleck (1966). Segue - se uma descrição sucinta do procedimento adotado para o fracionamento das preparações de núcleos e homogenatos.

Amostras triplicatas eram precipitadas no gelo, durante 20 min., com concentração final de PCA igual a 0,4 N. O precipitado obtido por centrifugação a 10000xg, 10 min., era lavado duas vezes com PCA 0,4 N . O material ácido-insolúvel era suspenso em NaOH 0,33 N e incubado durante 1 hora a 37°C. O digesto alcalino era acidificado com PCA (concentração final de 0,4 N) e mantido no gelo por 20 min. O precipitado obtido por centrifugação (10000xg, 10 min.), era lavado com PCA 0,4 N.

RNA era dosado no sobrenadante e DNA no precipitado.

O precipitado obtido por acidificação do digesto alcalino era dissolvido em NaOH 0,33 N, a 37°C, por 20 min. e dosado quanto ao teor de DNA, segundo o método de Ceriotti (1952). O padrão utilizado era 2-desoxi-D-ribose.

RNA era dosado no digesto alcalino com o reagente de orcinol (Dische, 1955), empregando D-ribose como padrão.

A dosagem de proteína era feita nas preparações de núcleos e homogenatos não fracionados, de acordo com o procedimento de Lowry et al. (1951). Albumina sérica bovina era empregada como padrão nas determinações.

7. Ensaio da atividade de RNA polimerase (E.C.2.7.7.6)

Os núcleos utilizados para a determinação da atividade de RNA polimerase, foram lavados por centrifugação (800xg, 10 min.) e suspensos em sacarose 0,25 M; MgCl₂ 1 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.

A mistura de incubação para o ensaio enzimático tinha a seguinte composição: 10 µCi/ml de ³H-UTP (11,7 Ci/mM); ATP 1 mM; GTP 0,4 mM; CTP 0,4 mM; DTT 4 mM; KCl 20 mM; MgCl₂ 4 mM; NaF 4 mM e Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6.

A reação era iniciada pela adição de uma alíquota da suspensão de núcleos contendo 15 µg de DNA. A incubação era feita a 30°C, sob agitação. A reação era paralizada por adição de 10 volumes de pirofosfato de sódio em TCA 20% e 200 µg de albumina para facilitar a precipitação, obtida por manutenção dos tubos durante 45 min. no gelo. Os precipitados recolhidos por centrifugação a 10000xg, por 15 min., eram lavados com pirofosfato de sódio 0,05 M em TCA 10% e depois com etanol 95%, contendo acetato de sódio 1%. Os precipitados eram hidrolizados com KOH 0,3 N por 1 hora a 37°C. O hidrolizado era acidificado com TCA até

concentração final de 10% e centrifugado (10000xg, 10 min.). A radioatividade incorporada em RNA era determinada no sobrenadante, constituído pelo material ácido-insolúvel, e sensível à hidrólise alcalina. O procedimento adotado reduz a radioatividade "background" a cerca de 4,5% da radioatividade incorporada em RNA, após 30 minutos de incubação. Aliquotas (50 μ l) do sobrenadante eram colocadas sobre filtros Whatman GF/A, que eram secos e contados em frascos contendo 10 ml de líquido de cintilação, contendo: hidroxil-hiamina 0,5% (v/v); 4 g/l de PPO; 100 mg/l de POPOP e tolueno q.s.p. A radioatividade era determinada em um cintilador Beckman LS-250, com eficiência de contagem de aproximadamente 37%.

Paralelamente, a atividade de RNA polimerase dos núcleos isolados, foi analisada em presença de actinomicina D e rifampicina, ao nível de 8 μ g por ml da mistura de incubação.

8. Purificação de mitocôndrias

Todas as operações eram realizadas entre 0 e 4°C. Células em fase exponencial de crescimento, eram sedimentadas e lavadas com sacarose 0,24 M; $MgCl_2$ 10 mM; KCl 10 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 por centrifugação a 1000xg durante 10 min. As células, suspensas em três volumes da mesma sacarose, contendo EDTA 5 mM em vez de $MgCl_2$ 10 mM, eram homogenizadas em um homogenizador tipo Dounce (10 movimentos). A extensão do rompimento celular era acompanhada ao microscópio de fase. O homogenato era centrifugado 10 minutos a 900xg e o sobrenadante obtido era centrifugado a 10000xg por 20 min. Os precipitados compactos obtidos eram submetidos a dois ciclos adicionais de centrifugação diferencial. A suspensão final de mitocôndrias, ao microscópio de fase, não apresentava núcleos ou células inteiras. A mesma contatação era feita ao microscópio eletrônico onde, todavia, era possível verificar a presença de fragmentos de membranas contaminantes.

9. Extração de DNA

O método descrito a seguir era utilizado, com as devidas adaptações, para extrair DNA celular total, nuclear e mitocondrial de trofozoitos e DNA total de cistos.

Todas as operações eram realizadas entre 0 e 4°C. A preparação em questão era lavada com NaCl 0,14 M, por centrifugação. O material centrifugado era pesado e suspenso em um meio de extração contendo dietilditiocarbamato de sódio 0,3 M e fenolftaleína difosfato 0,015 M, pH 7,5, na proporção de 8:1 (v/w). Adicionava-se SDS até concentração final de 2,5% (w/v) e a suspensão era homogenizada manualmente em um homogenizador tipo Potter-Elvehjem. O lisado era extraído com igual volume de uma mistura contendo 3 partes de fenol e 1 parte de meio de extração (v/v) durante 30 min. à temperatura ambiente. As soluções de fenol e meio de extração eram preparadas imediatamente antes de usar. Após a extração fenólica, a emulsão era centrifugada (10000xg, 15 min.) e a fase aquosa, extremamente viscosa, era removida e precipitada com 2 volumes de etanol. O precipitado fibroso, contendo os ácidos nucleicos era coletado com a ajuda de um bastão de vidro em rotação. Os ácidos nucleicos eram dissolvidos em SSC, num volume igual ao da fase aquosa da extração com fenol e incubados a 37°C com RNase pancreática (150 µg/ml, 1 hora) e pronase (500 µg/ml, 3 horas), ambas previamente aquecidas a 80°C por 15 minutos. Adicionalmente, o DNA era tratado com α-amilase (200 µg/ml, 2 h. a 37°C), previamente analisada quanto à contaminação por DNase. Seguia-se nova desproteínização, agora com fenol 88% (v/v), contendo 0,1% de hidróxi-quinolina. A fase aquosa era precipitada com 2 volumes de etanol. O DNA obtido era dissolvido em 0,1 SSC e precipitado com isopropanol, conforme descrito por Marmur (1961). Finalmente, o DNA era submetido a extensa diálise contra 0,1 SSC.

10. Centrifugação em gradientes de CsCl

a) Centrifugação preparativa

As preparações de DNA eram adicionalmente purificadas ou fracionadas em diferentes componentes, por centrifugação em gradientes de CsCl. O procedimento adotado era o seguinte: CsCl sólido era adicionado a 3,5 ml de solução de DNA contendo 1 a 20 unidades de absorvância (260 nm) em 0,1 SSC ou Tris-HCl 0,01 M, até ser obtida uma densidade inicial de $1,725 \text{ g/cm}^3$. A densidade da solução era determinada a partir do índice de refração (Ifft et al., 1961). A solução era distribuída em tubos de nitrocelulose, preenchidos com óleo mineral (Sigma). A centrifugação era feita no rotor SW 50.1 da ultracentrífuga Spenco L-3, a 38000 rpm e 25°C. Cerca de 40 frações com 8 gotas cada uma, eram recolhidas por punção no fundo do tubo, convenientemente diluídas com tampão e analisadas quanto à absorvância a 260nm. A linearidade do gradiente era verificada através do índice de refração das frações não diluídas. As frações com alta absorvância eram reunidas e dializadas contra o mesmo tampão. O DNA era coletado por centrifugação no rotor 50 Ti da Spenco L-3, a 40000 rpm, 4°C, durante cerca de 20 horas.

Em alguns experimentos, as frações dos gradientes eram analisadas quanto ao teor de hexoses e desoxirribose, determinado segundo os métodos descritos por Mockrash (1954) e Giles e Myers (1965), respectivamente. Os padrões utilizados nas dosagens eram D-glicose e 2-desoxi-D-ribose.

b) Centrifugação analítica (determinação da densidade de flutuação)

As soluções de DNA eram previamente dializadas contra NaCl 0,01 M e centrifugadas a 8000xg durante 45 minutos.

Amostras de DNA contendo cerca de 3 µg,

eram centrifugadas a 44000 rpm, durante 21 horas a 25°C, em gradiente de CsCl (ρ inicial = 1,700 g/cm³), contendo DNA do fago 2C de Bacillus subtilis (ρ = 1,742 g/cm³) como padrão de densidade. As análises eram realizadas em uma ultracentrífuga Spinco, modelo E, equipada com um sistema padronizado para a medida da absorção no ultravioleta, um monocromador e um "scanner" eletrônico. A densidade de flutuação era calculada segundo Vinograd e Hearst (1962), a partir da densidade de referência (1,742 g/cm³) e expressa em termos da densidade inicial da solução, à pressão atmosférica.

11. Fragmentação de DNA

Para a obtenção de fragmentos de DNA de baixo peso molecular, utilizava-se um Omni-Mixer da Sorvall Inc., equipado com um "micro-attachment", operando a 0°C. Cerca de 3 ml de solução contendo 100 µg de DNA/ml, eram agitados durante 30 minutos, com o dial na posição 8.

12. Avaliação de peso molecular

a) DNA nativo

O peso molecular (PM) era avaliado a partir da velocidade de sedimentação, determinada por centrifugação zonal em gradientes lineares de sacarose. O padrão de PM utilizado era o DNA do fago T₇, marcado com ³²P.

As amostras de DNA eram cuidadosamente colocadas sobre 25 ml de um gradiente de sacarose 5 a 20%, contendo NaCl 1 M; EDTA 1 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 7,8 (gradiente neutro) ou NaCl 0,9 M; EDTA 1 mM e NaOH 0,1 M (gradiente alcalino) e centrifugadas a 18000 rpm no rotor SW 25.1 (Spinco L-3), por 16 horas a 4°C. Frações de aproximadamente 1 ml eram coletadas a partir do fundo do tubo e analisadas quanto à absorbância a 260nm e radioatividade. A radioatividade era determinada por cintilação líquida na solução descrita

por Bray (1960), em um cintilador Beckman LS-250.

O PM do DNA nativo (gradientes neutros) era determinado conforme sugerido por Burgi e Hershey (1963) e o PM do DNA monocatenário (gradientes alcalinos), através da equação proposta por Studier (1965).

b) DNA fragmentado

O peso molecular de DNA fragmentado conforme descrito no item 11, era avaliado a partir da velocidade de sedimentação em gradientes lineares de sacarose 5 a 20% em SSC. O DNA era desnaturado com álcali, neutralizado e centrifugado no rotor SW 50.1 (Spinco), a 45000 rpm, durante 4 horas a 4°C.

O DNA utilizado como referência era o DNA do fago fd (circular, monocatenário), que, nas condições utilizadas, comporta-se como uma molécula linear com $S_{20,w}^0 = 24,4S$ (Colli et al., 1971). As constantes de sedimentação obtidas eram relacionadas aos pesos moleculares dos DNAs, através da equação proposta por Eigner e Doty (1965).

O procedimento empregado para a fragmentação de DNA produzia sempre uma população homogênea de moléculas, conforme sugerido pelos perfis de absorbância dos gradientes de sacarose, caracterizados por uma distribuição unimodal e gaussiana.

13) Renaturação de DNA

A renaturação de DNA era medida pela queda de absorbância a 260nm (Wetmur e Davidson, 1968), determinada em um espectrofotômetro Zeiss PMQ II. A temperatura das soluções de DNA, contidas em cubetas de quartzo com tampa de teflon, era mantida constante por circulação de água proveniente de um banho Colora (NB-36252, Germany), termostatizado a 60°C. As amostras de DNA em NaCl 1 M, eram desnaturadas por adição de 0,05 partes de NaOH 1 N e, depois de 15 min. neutralizadas com igual volume de NaH_2PO_4 2M. As so-

luções utilizadas para a desnaturação e neutralização eram mantidas a 60°C e adicionadas ao DNA contido na cubeta do espectrofotômetro com o auxílio de uma seringa termostaticada.

As experiências de renaturação empregavam sempre, preparações de DNA fragmentado conforme descrito no item 11. A tabela 6 (Resultados) mostra os valores de PM de algumas preparações de DNA.

14. Curvas de desnaturação térmica (Determinação de T_m)

A determinação de T_m foi realizada de acordo com o método de Mandel e Marmur (1968), utilizando o mesmo equipamento descrito para as experiências de renaturação. A temperatura era medida através de um termômetro especialmente adaptado para ficar imerso em uma solução de referência. Os diferentes DNAs estavam dissolvidos em 0,1 SSC e todos os dados eram corrigidos para expansão térmica.

VI. Resultados

1. Curvas de Crescimento

O crescimento foi testado em dois meios de cultura (A e B), sob diferentes condições de aeração (culturas agitadas e estacionárias). A figura 1 mostra os resultados obtidos. O crescimento em meio A é ligeiramente mais acentuado, tanto em culturas estacionárias, como agitadas. Culturas estacionárias caracterizam-se por crescimento máximo de cerca de 4×10^5 células/ml, atingido em torno do 18º dia de cultivo. Nessa ocasião, a maioria dos organismos apresenta forma esférica e há baixa porcentagem de cistos. Nas culturas agitadas, a fase logarítmica é mais longa, o número máximo de células/ml é maior ($2-7 \times 10^6$) e, a partir do 8º dia de cultivo, inicia-se o encistamento em massa das amebas. O nível de células presentes na fase estacionária é maior em culturas agitadas crescendo em tubos inclinados (maior aeração), do que em erlenmeyers. Conforme verificado por outros autores (Byers et al., 1969), o crescimento parece ser determinado pela quantidade de oxigênio dissolvido no meio.

As curvas de crescimento determinadas por contagem do número de células por ml de meio de cultura (Figura 1a) apresentam uma fase de crescimento exponencial e uma fase estacionária. A aparente fase de "lag" verificada quando o crescimento é medido por absorvância da cultura a 600nm (Figura 1A), pode ser explicada pela relação não linear existente entre absorvância e nº de células/ml (Tabela 1).

Para a obtenção de grandes quantidades de células, adotou-se, rotineiramente, a utilização de fermentador. Nessas condições, as curvas de crescimento obtidas são semelhantes às curvas de culturas agitadas em erlenmeyers, mostradas na Figura 1a.

Figura 1 - Crescimento de *A. castellanii* em diferentes condições de cultura. O crescimento foi medido por contagem do número de células por ml em câmara de Neubauer (gráfico a) ou por determinação da absorvância a 600 nm (gráfico A). Os resultados são a média de duas experiências. No gráfico a, os círculos e triângulos indicam, respectivamente, o crescimento de culturas agitadas e estacionárias em erlenmeyers. O crescimento foi determinado em meio A (símbolos vazios) e em meio B (símbolos cheios). Os círculos cheios interrompidos representam uma curva de crescimento em tubos sob agitação, contendo meio B. O gráfico A mostra o crescimento de culturas agitadas em meio A.

Tabela 1 - Relação entre absorbância a 600nm e número de organismos por ml em culturas de trofozoitos de A. castellanii

nº de células/ml	A ₆₀₀
1,2x10 ⁶	0,245
4,6x10 ⁵	0,155
2,3x10 ⁵	0,125
1,4x10 ⁵	0,120
5,4x10 ⁴	0,115
3,0x10 ⁴	0,115
2,1x10 ⁴	0,115
3,2x10 ³	0,115

Os dados foram obtidos com suspensões de células de uma cultura em fase logarítmica, diluídas com meio de crescimento estéril (média de três determinações). O número de organismos/ml foi medido por contagem em câmara de Neubauer; a absorbância foi determinada em um espectrofotômetro Coleman Jr. II.

2. Encistamento induzido

Obtinha-se, em média, 96% de encistamento, desde que o número de células por ml fôsse igual ou inferior a 10⁵. Densidade maior de células impedia o encistamento. Os cistos obtidos eram viáveis, conforme demonstrado pela germinação observada depois de 5 horas de incubação em meio de crescimento. O encistamento foi acompanhado ao microscópio de fase, tendo sido possível constatar a saída da ameba por um dos ostíolos da parede do cisto que permanece intacta no final do processo.

3. Isolamento de núcleos

A maior parte dos métodos testados não produzia lise celular adequada. O método de Blobel e Potter (1967) modificado, proporcionava um homogenato contendo baixa porcentagem de células inteiras e núcleos aparentemente íntegros. Todavia, não foi possível obter purificação dos núcleos por ultracentrifugação. A adoção do método descrito por Rozijn e Tonino (1964), sem modificações, produzia homogenato com grande número de células intactas. O procedimento adotado rotineiramente (Marzzoco e Colli, 1974) é uma modificação desse método e permite obter isolamento e purificação de núcleos em espaço de tempo relativamente curto (90 minutos após homogenização). A homogenização das células por passagem em seringa com agulha hipodérmica, constitui um método eficiente, já que a porcentagem de células intactas na fração nuclear era em torno de 3%. A fração nuclear impura, resultante da centrifugação em baixa velocidade do homogenato, é altamente purificada por ultracentrifugação em gradientes descontínuos de soluções concentradas de sacarose. A pureza das preparações de núcleos era verificada por microscopia óptica e eletrônica. A figura 2 mostra o aspecto da suspensão final de núcleos isolados, onde é possível observar a ausência de células inteiras e fragmentos de membranas. Micrografias eletrônicas (Figura 3), mostram núcleos intactos, envolvidos por um envelope duplo, com ribossomos aderidos à membrana externa. Nucléolos grandes e densos, que são característicos dessa espécie, também podem ser vistos. O grau de preservação estrutural mantido pelos núcleos isolados é constatado por comparação com micrografia de núcleos "in situ", conforme ilustrado na figura 3. Os meios de extração utilizados contêm 8% de polivinil-pirrolidona, necessária para manter a integridade dos núcleos durante o isolamento (Rozijn e Tonino, 1964). O meio de homogenização contém, adicionalmente, baixa concentração (0,02%) do detergente Tri

ton X-100, que acelera a lise celular e propicia melhor dispersão dos componentes celulares liberados, além de ser um inibidor de DNase (Hymer e Kuff, 1966). O rendimento de núcleos é de aproximadamente 80% conforme avaliado pela recuperação de DNA (Tabela 2).

Figura 2 - Aspecto de uma preparação de núcleos de trofozoitos de A. castellanii, suspensos em meio PVP-sacarose 0,6 M ao microscópio de fase. Os núcleos estão intactos e não se observam células inteiras ou fragmentos de membrana. Aumento = 2560 vezes.

(a)

(b)

Figura 3 - Micrografias de núcleos de A. castellanii. A preparação do material para microscopia eletrônica está descrita em Métodos. A foto (a) mostra o grau de preservação estrutural mantido pelos núcleos isolados, como pode ser observado por comparação com a aparência dos núcleos "in situ", mostrada na foto (b). Os aumentos das fotos (a) e (b) são respectivamente iguais a 14000 e 10000 vezes.

Tabela 2 - Composição química de núcleos isolados de trofozoitos
de A. castellanii

	DNA		RNA		Proteína		RNA		Proteína	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Núcleos	0,115±0,032	20,5	0,023±0,005	4,1	0,422±0,029	75,4	0,2	0,2	3,7	3,7
Homogenato	0,143±0,015	0,64	2,18±0,26	9,8	20,0±1,1	89,6	15,3	15,3	140,3	140,3

Os números se referem a núcleos isolados de 1 ml de homogenato 25% (w/v). Os resultados para 1 ml de homogenato são incluídos para comparação. Valores médios de triplicatas de 4 experimentos independentes são dados $\pm$ o desvio padrão.

4. Composição química de núcleos isolados

A tabela 2 mostra os resultados relativos ao teor de DNA, RNA e proteína, no homogenato e núcleos purificados. Os resultados mostram que 80% do DNA do homogenato foi recuperado no precipitado de núcleos. As preparações de núcleos utilizadas para o estudo da composição química também foram analisadas quanto ao número de núcleos por ml, através de contagem em câmara de Neubauer ao microscópio de fase. Com esses resultados e os dados da tabela 2, foi possível avaliar a composição média por núcleo, que era igual a 38,8; 2,1 e 10,6 pg de proteína, RNA e DNA, respectivamente.

5. Atividade de RNA polimerase(E.C.2.7.7.6) em núcleos isolados

A figura 4 mostra os resultados da cinética da reação catalisada pela RNA polimerase da fração nuclear. Nas condições de incubação adotadas, a velocidade da reação diminui logo após os primeiros 5 minutos de incubação. A velocidade inicial de síntese de RNA nos núcleos isolados, conforme avaliada pela incorporação de UMP em RNA, era igual a 83 picomoles de UMP/min/mg de DNA a 30°C. Essa velocidade, todavia, pode estar um pouco subestimada, já que não foi considerada a possibilidade da existência de um "pool" endógeno de UMP, que poderia influenciar os resultados nas condições de ensaio empregadas. Conforme esperado para uma reação DNA-dependente, a adição de actinomicina D, ao nível de 8 µg/ml, reduz a incorporação de radioatividade em RNA de cerca de 80%. Por outro lado, rifampicina, conhecido inibidor de síntese de RNA bacteriano (di Mauro et al., 1969) e mitocondrial (Mukerjee e Goldfeder, 1973), não teve nenhum efeito na enzima nuclear da ameba. Os resultados estão resumidos na tabela 3.

Figura 4 - Cinética de incorporação de UMP-³H em núcleos isolados de trofozoitos de A. castellanii. A radioatividade TCA precipitável e sensível à hidrólise alcalina foi determinada conforme descrito em Métodos. O nº de cpm/ml da mistura de incubação é registrado em função do tempo de reação a 30°C.

Tabela 3 - Efeito de antibióticos na reação catalizada pela RNA polimerase de núcleos isolados de A. castellanii.

Adições	cpm/mg de DNA (x10 ⁻⁶)	% de inibição
-	5,32	-
actinomicina D	0,96	82
rifampicina	5,72	zero

Condições de ensaio descritas em Métodos. Resultados obtidos por incubação durante 10 minutos a 30°C. A concentração de antibióticos testada foi de 8 µg/ml.

6. Extração de DNA

O DNA total de trofozoitos, obtido pelo procedimento descrito em Métodos (Marzzoco e Colli, 1974), apresenta espectro de absorção característico, ilustrado na figura 5. Inicialmente, o DNA não era tratado com α-amilase (Adam et al., 1969), fornecendo um espectro de absorção atípico, provavelmente devido à contaminação por glicogênio, conforme sugerido pela comparação entre o espectro de absorção de DNA não tratado com α-amilase e glicogênio comercial, no ultra violeta (Figura 5). O glicogênio utilizado (Sigma), foi analisado quanto ao teor de hexoses (reação de antro - ma), DNA (Reação de difenilamina), RNA (reação de orcinol) e proteína (reação de Folin-Ciocalteu). Os resultados obtidos mostram que a preparação de glicogênio é realmente pura, contendo baixa porcentagem de proteínas (0,3%) e ácidos nucleicos (cerca de 0,1%) contaminantes.

Figura 5 - Espectro de absorção de DNA total de trofozoitos tratado ou não com α -amilase e de glicogênio comercial (Sigma). A concentração de DNA tratado com α -amilase (círculos cheios) e DNA não tratado (círculos vazios, linha pontilhada), conforme avaliado pela absorbância a 260nm, era igual a 22 μ g/ml. A concentração de glicogênio (círculos vazios, linha cheia), determinada por reação com antrona, era igual a 3 mg/ml. As soluções eram feitas em 0,1SSC e a absorbância no ultra-violeta medida em um espectrofotômetro Zeiss PMQ II.

O DNA nuclear também apresentava razões de absorbância típicas: $230/260 \text{ nm} = 0,435$ e $280/260 \text{ nm} = 0,534$.

O peso molecular do DNA nativo, utilizando-se DNA radioativo do fago T_7 como padrão, variava de 8 a 12×10^6 daltons (gradientes de sacarose neutros). Em gradientes alcalinos, obtinha-se um valor de peso molecular próximo à metade do peso molecular do DNA nativo.

7. Centrifugação em gradientes de CsCl

a) DNA total de trofozoitos

A análise do perfil do DNA total de trofozoitos em gradientes de densidade preparativos, sugeria, inicialmente, a presença de dois satélites com densidade menor que o componente principal, conforme evidenciado na figura 6B. O satélite menos denso, situava-se na mesma região de densidade que glicogênio comercial (Sigma) (Figura 6A). As frações indicadas pela barra presente na figura 6B, foram reunidas e submetidas à centrifugação analítica em gradientes de CsCl. O perfil obtido (Figura 6b), confirma a existência de dois satélites: um com densidade igual a $1,692 \text{ g/cm}^3$ e outro com densidade igual a $1,670 \text{ g/cm}^3$. Esta última banda tem um comportamento anômalo, já que absorve radiação de 320 nm (Figura 6a). Na tentativa de elucidar a natureza dessa banda, foi feita a dosagem de desoxirribose (reação de difenilamina) e hexoses (reação de antrona), em cada fração de gradientes preparativos de DNA total tratado ou não com α -amilase. A figura 7 mostra os resultados obtidos. A banda anômala (componente menos denso), não contém DNA (Figura 7A), mas contém grande quantidade de hexoses, de acordo com a reação fortemente positiva com o reagente de antrona. Essa banda é composta provavelmente por glicogênio, porque é sensível à ação de α -amilase, que elimina o material antrona-positivo (Fi-

Figura 6 - Perfil de absorvância de DNA total de trofozoitos de A. castellanii e glicogênio comercial, após centrifugação em gradientes de CsCl. As figuras A e B mostram os resultados obtidos com gradientes preparativos contendo 2 mg de glicogênio (Sigma) e 146 µg de DNA total respectivamente. As figuras a e b mostram o perfil a 320 e 260nm, obtido por centrifugação analítica das frações do gradiente B indicados pela barra horizontal que foram reunidas e dializadas contra NaCl 0,01 M. Condições de centrifugação descritas em Métodos. Na figura b, o pico com densidade igual a 1,742g/cm³, refere-se ao DNA do fago 2C, utilizado como marcador.

Figura 7 - Centrifugação de DNA total de trofozoitos de *A. castellanii* em gradientes de CsCl. As figuras A e B mostram os resultados da medida de absorbância a 260nm (círculos cheios), dosagem com difenilamina (círculos vazios) e dosagem com antrona (círculos vazios pontilhados), nas frações de gradientes contendo DNA total tratado ou não com α -amilase respectivamente. Condições de centrifugação descritas em Métodos.

gura 7B). As outras duas bandas observadas são realmente constituídas por DNA, conforme evidenciado pela superposição do perfil de absorbância a 260nm e absorbância de desoxirribose, medida pela reação com difenilamina (Figura 7A e B). Além disso, o tubo do gradiente de CsCl contendo DNA não tratado com α -amilase, apresenta uma banda opalescente que é eliminada por tratamento com α -amilase (Figura 8).

Figura 8 - Fotografia de gradientes de DNA total de trofozoitos, centrifugados conforme descrito em Métodos. O tubo da direita contém DNA não tratado com α -amilase e apresenta uma banda clara que desaparece após tratamento com α -amilase (tubo da esquerda).

Portanto, o DNA total de trofozoitos apresenta um componente maior (84% do DNA celular total) e um componente menor (16%), com densidades respectivamente iguais a 1,717 e 1,692 g/cm³. Os perfis do DNA total em gradiente preparativo e analítico de CsCl podem ser vistos nas figuras 9b e 9B, respectivamente.

b) DNA nuclear de trofozoitos

O perfil do DNA nuclear, fragmentado até peso molecular igual a 6×10^5 daltons, tem uma distribuição unimodal em gradientes de CsCl (Figura 9a), caracterizado por densidade igual a 1,717 g/cm³ (Figura 9A). Esses resultados indicam claramente a origem nuclear do componente maior do DNA total (Figura 9B).

c) DNA mitocondrial de trofozoitos

O DNA de mitocôndrias isoladas conforme descrito em Métodos, foi purificado por fracionamento em gradientes de CsCl (Figura 10A). O perfil de sedimentação obtido em gradientes analíticos (Figura 10B), mostra a existência de uma única banda, com densidade de flutuação igual a 1,692 g/cm³.

d) DNA total de cistos

O perfil do DNA de cistos em gradientes de CsCl (Figura 11A), mostra a presença de dois componentes com densidades idênticas a dos componentes do DNA total de trofozoitos: 1,717 e 1,692 g/cm³ (Figura 11B). O componente maior representa aproximadamente 93% do DNA celular total e o componente menor 7%.

Figura 9 - Centrifugação em gradientes de CsCl de DNA total e nuclear de trofozoitos. As figuras a e b mostram os resultados de gradientes preparativos contendo, respectivamente, 157 μg de DNA nuclear fragmentado ($\text{PM} = 6 \times 10^5$) e 109 μg de DNA total nativo. O perfil de A_{260} após centrifugação isopícnica e as densidades obtidas são apresentadas na figura A (DNA nuclear) e figura B (DNA total). DNA marcador de fago 2C tem densidade igual a 1,742 g/cm³.

Figura 10 - Centrifugação de DNA mitocondrial em gradientes de CsCl. A figura A mostra o perfil de absorbância de 60 μg de DNA, fracionado por centrifugação em gradiente preparativo. A barra indica as frações que foram reunidas, dializadas contra NaCl 0,01 M e submetidas à centrifugação analítica, cujo traçado fotoelétrico pôde ser visto na figura B. A contaminação por material com densidade igual a 1,717 g/cm^3 é muito baixa. O marcador de densidade é o DNA do fago 2C ($\rho = 1,742 \text{ g/cm}^3$). Condições de centrifugação descritas em Métodos.

Figura 11 - Centrifugação de DNA total de cistos de A. castellanii em gradientes de CsCl. Os picos obtidos por centrifugação preparativa de 34 μ g de DNA (Figura A), são caracterizados pelos valores de densidade de flutuação mostrados no perfil fotoelétrico obtido na centrífuga analítica (Figura B). DNA de fago 2C ($\rho = 1,742 \text{ g/cm}^3$) é o marcador utilizado. Maiores detalhes em Métodos.

e) DNA total de trofozoitos em diferentes estágios de crescimento.

A figura 12 mostra o perfil, em gradientes de CsCl analíticos do DNA de células em fase logarítmica precoce (12A), mediana (12B) e tardia (12C). Aparentemente, há uma variação da fração do DNA celular representada pelo componente menor. A tabela 4 resume as características de cada fase da cultura quanto à densidade de células, número de cistos e porcentagem do componente menor.

Tabela 4 - Variação da porcentagem do componente menor do DNA total de trofozoitos em diferentes fases de crescimento.

Etapas da fase log	Nº de células por ml	% de cistos	% do componente menor
Precoce	4×10^4	zero	4
Mediana	5×10^5	1	16
Tardia	1×10^6	11	6

O nº de cél/ml e a % de cistos foram determinados por contagem em câmara de Neubauer. As etapas da fase logarítmica foram delimitadas de acordo com as curvas de crescimento de culturas agitadas em erlenmeyers (Figura 1). As porcentagens do componente menor, em relação ao DNA total, foram obtidas a partir da área dos picos obtidos por centrifugação em CsCl (Figura 12). Os resultados representam a média de dois experimentos isolados.

Figura 12 - Traçado do registro fotográfico obtido após centrifugação analítica em gradientes de CsCl de DNA total de trofozoitos em diferentes fases de crescimento. As figuras A, B e C, representam, respectivamente, os resultados obtidos com DNA de células em fase logarítmica precoce, mediana e tardia. DNA de fago 2C ($\rho = 1,742 \text{ g/cm}^3$) é o marcador de densidade utilizado. Condições de centrifugação descritas em Métodos.

8. Perfil de fusão dos componentes do DNA de trofozoito

a) DNA total

A figura 13 mostra a desnaturação do DNA total, onde a transição ocorre ao longo de um grande intervalo de temperaturas. A primeira derivada do perfil de fusão (Figura 13A), confirma a existência de dois componentes, caracterizados por valores de T_m iguais a $75,5^{\circ}\text{C}$ (componente maior) e 63°C (componente menor). A determinação do T_m foi feita para os dois componentes, após fracionamento por centrifugação em gradientes de CsCl.

b) Componente maior do DNA total e DNA nuclear

A transição em torno do T_m é abrupta (Figura 14a) e a curva derivada (Figura 14A) mostra um pico gaussiano. O valor médio de T_m é igual a $75,5^{\circ}\text{C}$. O DNA nuclear apresenta comportamento idêntico ao componente maior (ver figura 14).

c) Componente menor e DNA mitocondrial

O componente menor (Figura 15 A e B), não apresenta uma curva derivada simétrica, distinguindo-se três componentes com T_m em torno de 62; 65 e 75°C . A figura 15 A mostra, ainda, a curva derivada do perfil de fusão do DNA mitocondrial, também plurimodal, mas que não se superpõe à curva derivada do componente menor.

Figura 13 - Curvas de desnaturação térmica do DNA total de trofozoitos, em 0,1SSC (24 $\mu\text{g/ml}$). A figura a mostra a variação de absorbância relativa (corrigida para expansão térmica), em função da temperatura da solução. A figura A mostra a curva diferencial de fusão, onde a ordenada (Y) indica a variação da % de hipercromicidade por grau:

$$Y = \frac{(At_1 - At_2)/(A_{100} - A_{25})}{(t_1 - t_2)}$$

onde At_1 , At_2 , A_{100} e A_{25} são as absorbâncias medidas nas temperaturas t_1 , t_2 , 100 e 25°C, respectivamente. Os valores na abcissa são iguais a $t_1 + t_2/2$. As absorbâncias foram determinadas em um espectrofotômetro Zeiss PMQII, conforme descrito em Métodos.

Figura 14 - Perfil de fusão do DNA nuclear e componente maior do DNA total de trofozoitos, em 0,1 SSC. Os valores de absorbância relativa das soluções de DNA nuclear (18 $\mu\text{g/ml}$, círculos cheios) e componente maior (20 $\mu\text{g/ml}$, círculos vazios), corrigidos para expansão térmica, são registrados em função da temperatura da solução (Figura a). A figura A mostra a curva derivada da desnaturação, onde a ordenada (Y) representa o incremento em absorbância relativa por grau. No eixo das abscissas estão indicadas as temperaturas médias dos intervalos. Para maiores detalhes, ver legenda da figura 13.

Figura 15 - Perfil de desnaturação térmica do componente menor do DNA total de trofozoitos (14 $\mu\text{g/ml}$), em 0,1 SSC. A figura a representa a variação de absorbância relativa, corrigida para expansão de volume, em função da temperatura. Na curva diferencial de fusão (Figura A), as ordenadas indicam a variação da % de hipercromicidade por grau. Os valores em abscissas referem-se à temperatura média dos intervalos considerados. A figura A mostra, ainda, os resultados obtidos com uma preparação de DNA mitocondrial (13 $\mu\text{g/ml}$, círculos vazios), que exibe comportamento heterogêneo, como o componente menor (círculos cheios). Maiores detalhes na legenda da Figura 13.

A tabela 5 resume algumas característi -
cas do DNA de trofozoitos.

Tabela 5 - Propriedades físicas dos compo-
nentes do DNA de trofozoitos de A. castellanii.

DNA	Densidade (g/cm ³)	T _m (°C)	% GC	
			(densidade)	(T _m)
Total				
componente maior	1,717	75,5	58,2	52,7
componente menor	1,692	63,0	32,7	22,2
Nuclear	1,717	75,5	58,2	52,7

A determinação de densidade e T_m está descrita em Mé-
todos. A % de GC (fração molar) foi calculada a par-
tir da densidade ou T_m (em 0,1 SSC) de cada DNA, se-
gundo as equações empíricas de Mandel et al. (1968) e
Mandel e Marmur (1968).

9. Renaturação de DNA

Os resultados obtidos através da análise
espectrofotométrica da cinética de renaturação, podem
ser analisados segundo a equação proposta por Wetmur
e Davidson (1968):

$$\frac{1}{A - A_{\infty}} = 2,04 \times 10^{-4} k_2 t + \frac{1}{0,36A_{\infty}}$$

A_∞ = absorbância do DNA nativo (260nm)

A = absorbância em tempo t (segundos)

k₂ = constante de segunda ordem

Nessa equação, o fator de hipercromicidade
(aumento de absorbância devido à desnaturação), conside-

rando-se um erro experimental de 5%, é dado por:

$$A_0 - A_\infty = 0,36 A_\infty$$

A_0 = absorvância do DNA desnaturado

Portanto, colocando-se em um gráfico, os valores dos inversos da hipercromicidade residual ($1/A - A_\infty$), em função do tempo de reação, obtém-se uma linha reta. O coeficiente angular da reta, dividido por ($2,04 \times 10^{-4}$), fornece o valor da constante de segunda ordem (k_2).

A razão entre as velocidades de renaturação de dois DNAs com o mesmo peso molecular, obtido por métodos de fragmentação semelhantes, é inversamente proporcional à razão entre o peso molecular das moléculas de DNA não fragmentado (complexidade). Assim, a complexidade de um DNA pode ser obtida a partir da determinação experimental da constante de velocidade de renaturação desse DNA e de outro DNA com complexidade conhecida, nas mesmas condições de incubação (Britten e Kohne, 1967; Wetmur e Davidson, 1968). DNAs de bactérias ou vírus são cineticamente homogêneos, ou seja, sua renaturação é representada por uma única reta. A renaturação de DNAs heterogêneos, como ocorre nos organismos superiores, fornece uma curva de renaturação complexa que pode ser subdividida em retas que representam a renaturação de diferentes famílias de DNA.

Neste trabalho, a reação de renaturação foi acompanhada pela queda da absorvância a 260nm. As constantes de velocidade de renaturação dos diferentes componentes do DNA da ameba, foram calculadas a partir do coeficiente angular das retas obtidas em gráficos do tipo sugerido por Wetmur e Davidson (1968), mostrados nas figuras 16-19. As retas apresentadas representam as retas médias obtidas por um conjunto de pontos experimentais submetidos à análise de regressão linear, em um calculador Hewlett-Packard, modelo 9820A. O programa de regressão linear foi gentilmente cedido pela Dra. Helena Li Chum. O coeficiente de variância do desvio padrão da inclinação e do intercepto das re-

tas era, em média, 5% e 0,4%, respectivamente. O coeficiente de correlação médio era igual a 0,98. Os valores de coeficiente angular e linear das retas médias foram submetidos ao teste t de Student, monocaudal, e foram considerados significativos nas 23 experiências de renaturação consideradas.

O padrão utilizado nas medidas de renaturação foi o DNA de E. coli, que é um DNA homogêneo, constituído predominantemente por sequências únicas e com complexidade bem estabelecida (Cairns, 1963). A figura 16 mostra a renaturação do DNA de E. coli, representada, conforme esperado, por uma única reta. A mesma figura mostra a renaturação do DNA celular total de trofozoítos de A. castellanii, que exhibe comportamento heterogêneo. A curva de renaturação desse DNA pode ser dividida em 4 seções, indicando a presença de 4 famílias de DNA com diferentes velocidades de renaturação. A contribuição de cada fração pode ser calculada por extrapolação da reta que representa a fração de renaturação mais lenta, ao valor de $1/A - A_{\infty}$ em tempo zero de reação (Wells e Birnstiel, 1969). O inverso desse valor fornece a hipercromicidade devida à fração lenta. O mesmo procedimento é adotado para as outras frações. Comparando-se o valor obtido para cada fração com o valor de hipercromicidade total ($A_0 - A_{\infty} = 100\%$), é possível calcular a porcentagem do genoma correspondente a cada família de DNA. Por analogia com as famílias do DNA de outros organismos superiores (Britten et al., 1972), as famílias de DNA da ameba foram denominadas de "rápida", "intermediária", "lenta" e "única", admitindo-se que a fração que renatura mais lentamente seja constituída por DNA "único". Os valores médios de porcentagem obtidos para as famílias do DNA total foram respectivamente de: 86; 7,5; 4 e 2,5%.

Após longos períodos de incubação, quando a maior parte das sequências com renaturação rápida já reagiu, a inclinação da curva de renaturação representa, efetivamente, a fração de DNA com renaturação mais lenta (DNA "único"). Como essa fração representa a

Figura 16 - Renaturação do DNA total de trofozoitos de A. castellanii (49 $\mu\text{g/ml}$) e DNA de E. coli (32 $\mu\text{g/ml}$), em NaCl 1 M a 60°C. Os valores do inverso da hipercromaticidade residual são medidos em função do tempo de reação. A_{∞} e A representam, respectivamente, a absorvância a 260nm, das soluções de DNA nativo e DNA parcialmente renaturado em diferentes tempos de reação. DNA de E. coli (círculos cheios, ordenada do lado direito), mostra a relação linear esperada e DNA total da ameba (círculos vazios, ordenada do lado esquerdo) comporta-se heterogêneamente. Porcentagens do genoma da ameba são obtidas a partir dos interceptos das diferentes secções da curva de reassociação, obtidos por regressão linear. A metade inferior da figura representa, em escala aumentada, os dados relativos à parte inicial (tempo de incubação de zero a 3×10^{-3} seg.) da reação de renaturação do DNA total da ameba.

maior parte do genoma (86%), pode-se assumir que o k_2 aparente, calculado a partir da inclinação final da curva de renaturação (Figura 16, 4ª reta do DNA total; Tabela 6), aproxima-se muito da constante verdadeira de segunda ordem para o DNA de renaturação mais lenta (DNA "único").

Tabela 6 - Cinética de renaturação de diferentes frações do DNA total de trofozoitos de A. castellanii.

DNA	Peso Molecular x 10^5 (daltons)	k_2
componente menor	5,4	23,5 6,7 0,68
mitochondrial	4,9	5,2 0,69
componente maior	15,4	0,109
nuclear	6,2	0,118
total (4ª reta)	10,7	0,09
<u>E. coli</u>	9,5	5,74

Os DNAs foram dissolvidos em NaCl 1 M e incubados a 60°C. A cinética de renaturação foi analisada pelo método óptico e as constantes aparentes de velocidade calculadas segundo Wetmur e Davidson (1968). Os valores de k_2 (média de 3 determinações), foram normalizados para PM = $9,5 \times 10^5$ daltons (Wetmur e Davidson, 1968). O peso molecular foi determinado conforme descrito em Métodos. Unidades de k_2 = mol.seg. l^{-1}).

O cálculo das constantes de velocidade das famílias de renaturação mais rápida, é prejudicado pelo número relativamente grande de componentes, de modo que a renaturação de cada família é afetada pela renaturação da outra. Além disso, quando se analisa a renaturação das famílias que reagem inicialmente, a contribuição de hipercromicidade de cada fração está sendo constantemente alterada pela fração lenta, presente em todas as fases da renaturação. Quando apenas dois componentes estão presentes, pode-se conseguir uma aproximação do valor de k_2 verdadeiro para a fração "rápida", através do método de correção sugerido por Wetmur (1967) e Wells e Birnstiel (1969). Balsamo (1972) sugeriu um método de correção adequado para a determinação do k_2 verdadeiro quando existem três famílias com velocidades de renaturação diferentes. A superposição das retas na renaturação do DNA total da ameba dificulta o cálculo das constantes aparentes e o número de componentes observada impede a aplicação dos métodos de correção citados.

Uma melhor resolução entre as retas pode ser obtida através da renaturação dos dois componentes do DNA total da ameba, isolados em gradientes de CsCl.

A figura 17 mostra o perfil de renaturação do componente menor do DNA total de trofozoitos que apresenta um comportamento cinético heterogêneo, com três velocidades de renaturação diferentes, caracterizadas pelos valores de k_2 aparentes citados na tabela 6. O componente maior (Figura 18) comporta-se como um DNA muito homogêneo, não apresentando sequências com renaturação rápida. O valor médio da constante de segunda ordem para a reação observada, encontra-se na tabela 6.

DNA de núcleos isolados apresenta características de renaturação praticamente iguais às do componente maior (Figura 18 e Tabela 6). A comparação entre a porcentagem do genoma, perfil de renaturação e valores de k_2 do componente maior, DNA nuclear e

Figura 17 - Renaturação do componente menor do DNA total de trofozoitos de A. castellanii. O componente menor foi isolado por centrifugação em gradientes de CsCl, dissolvido em NaCl 1 M e incubado a 60°C. A metade inferior da figura representa a reação em tempos maiores de incubação, mostrando apenas as retas da figura superior que mostra, em escala aumentada, os dados para os primeiros 2000 seg. de renaturação. As constantes aparentes (k_2) são calculadas a partir do coeficiente angular das tres retas obtidas por regressão linear. As abreviações empregadas são as mesmas da Figura 16.

Figura 18 - Renaturação do DNA "único" de trofozoitos de A. castellanii. O componente maior (54 $\mu\text{g/ml}$), purificado em gradientes de CsCl e o DNA nuclear (53 $\mu\text{g/ml}$) foram dissolvidos em NaCl 1 M e incubados a 60°C. Os círculos vazios e cheios representam a renaturação do componente maior e DNA nuclear respectivamente. A constante de segunda ordem (k_2) foi calculada segundo Wetmur e Davidson (1968), a partir da inclinação da reta média obtida por regressão linear. Para maiores detalhes, ver legenda da Figura 16.

4ª reta do DNA total, indica que esses componentes se referem à fração do DNA da ameba que apresenta renaturação mais lenta (fração "única"). A partir do valor da constante de renaturação do DNA de E. coli, renaturado nas mesmas condições, é possível estimar a complexidade do DNA nuclear (fração "única"), por comparação com o genoma de E. coli, igual a $2,7 \times 10^9$ daltons (Cairns, 1963). Para isso, os valores de k_2 observados foram normalizados para o mesmo peso molecular, através da equação proposta por Wetmur e Davidson (1968), que demonstra a proporção existente entre a raiz quadrada do peso molecular e a constante de segunda ordem. A partir do valor médio de k_2 determinado para a fração "única" (0,106), a complexidade do DNA nuclear de A. castellanii pode ser estimada em $1,46 \times 10^{11}$ daltons.

A renaturação do DNA de mitocôndrias também é heterogênea, mostrando a existência de duas frações (Figura 19), com velocidades de renaturação definidas por constantes aparentes, cujos valores estão na Tabela 6. Esses resultados indicam que o componente menor do DNA total não é exatamente idêntico ao DNA de mitocôndria que não contém as sequências de renaturação "rápida", mas contém as sequências de renaturação "intermediária" e "lenta".

As constantes verdadeiras para as diferentes famílias presentes no DNA mitocondrial e componente menor poderiam ser obtidas através da aplicação dos métodos de correção mencionados anteriormente (Wetmur, 1967; Wells e Birnstiel, 1969; Balsamo, 1972), desde que a fração "lenta" apresentasse características cinéticas de DNA "único". Entretanto, os resultados obtidos (localização mitocondrial, valor de k_2 aparente e porcentagem do genoma), podem ser interpretados supondo-se que essa fração do DNA fôsse constituída por sequências com baixa frequência de repetição. Esse resultado torna muito difícil o cálculo do k_2 verdadeiro e, conseqüentemente, da complexidade cinética das famílias do componente menor e DNA mitocondrial, a partir de gráficos do tipo sugerido por Wetmur e Davidson (1968).

Figura 19 - Renaturaço do DNA mitocondrial de trofozoitos de A. castellanii. DNA de mitocndrias isoladas conforme descrito em Mtodos, foi dissolvido em NaCl 1 M (18 $\mu\text{g/ml}$) e reassociado a 60C. O k_2 aparente das duas retas componentes foi determinado a partir do coeficiente angular obtido por regresso linear. As abreviaes empregadas so as mesmas da Figura 16.

Todavia, os resultados de cinética de renaturação podem ser apresentados de maneira mais conveniente, conforme sugerido por Britten e Kohne (1967), o que constitui um método alternativo para a determinação da complexidade cinética e tem a vantagem de permitir a comparação entre reações com concentrações diferentes de DNA, além de mostrar claramente se o DNA em estudo é homogêneo ou não. Neste tipo de gráfico (Figuras 20 e 21), a fração de DNA reassociado ($(A_0 - A) / A_0 - A_\infty$) é colocada em função do logaritmo do produto da concentração inicial de DNA pelo tempo de reação ($\log \text{Cot}$). Os valores de "Cot" são expressos em moles de nucleotídeos por litro por segundos ($\text{mol} \cdot \text{seg} \cdot \text{l}^{-1}$). Cot igual a 1 resulta da incubação por 1 hora de DNA em uma concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nesse tipo de gráfico, uma reação ideal de segunda ordem fornece uma curva simétrica, cuja parte central se ajusta a uma reta. A inclinação dessa reta é estimada pela razão entre os valores de Cot que a linha intercepta no início e fim da reação e serve como diagnóstico na determinação do grau de homogeneidade do DNA. Para uma reação ideal, a razão é próxima de 100 (2 unidades de $\log$ de Cot); se a razão for maior do que 100, a reação é heterogênea, isto é, espécies com velocidades de renaturação diferentes estão presentes.

Britten e Kohne (1967) desenvolveram equações que permitem analisar a cinética de renaturação, considerando Cot como o parâmetro que controla a velocidade da reação. No caso de DNA único, o Cot necessário para 50% de reassociação ($\text{Cot}_{1/2}$), é proporcional ao tamanho do genoma (G):

$$\text{Cot}_{1/2} = \frac{G}{K} \quad (1)$$

A constante de proporcionalidade (K) é avaliada pela medida, em condições idênticas, da velocidade de reassociação do DNA de um organismo com genoma conhecido, sem repetição significativa.

Quando uma família de DNA formada por uma sequência de nucleotídeos repetida x_i vezes esti-

Figura 20 - Renaturação de diferentes preparações de DNA. A reassociação ($\text{NaCl } 1 \text{ M}$; 60°C), foi medida espectrofotometricamente, pela hipocromicidade desenvolvida a 260nm . A fração de DNA reassociado ($A_0 - A / A_0 - A_{\infty}$) é colocada em função do logaritmo do produto da concentração de DNA (C_0) expressa em moles de nucleotídeos/l, pelo tempo de incubação (segundos) (Britten e Kohne, 1968). A ordenada no lado direito do gráfico, refere-se à renaturação do DNA de *E. coli* (linha cheia, círculos vazios) e a da esquerda à renaturação do DNA total (linha cheia, círculos cheios) e nuclear (linha pontilhada, círculos cheios e vazios) de trofozoítos de *A. castellanii*. A curva de reassociação do DNA nuclear (linha pontilhada), ilustra o efeito da concentração de DNA na velocidade da reação: círculos vazios, $53 \mu\text{g/ml}$ e círculos cheios, $39 \mu\text{g/ml}$. As setas no eixo das abscissas indicam os valores de C_0 onde metade do DNA deveria reassociar de acordo com vários graus de repetição. Concentração de DNA de *E. coli* e DNA total = $33 \mu\text{g/ml}$.

Figura 21 - Renaturação do DNA reiterado de *A. castellanii*. As condições de incubação e outros detalhes são os mesmos da Figura 20. O perfil de reassociação do DNA de *E. coli* (linha cheia, escala da direita), ilustra a heterogeneidade cinética dos outros dois DNAs. O $Cot(1/2)$ para as três secções distintas da curva de reassociação do componente menor (círculos cheios) e para as duas retas do DNA mitocondrial (círculos vazios), foi calculado segundo Britten e Kohne (1967), considerando como padrão o $Cot(1/2)$ do DNA de *E. coli* renaturado nas mesmas condições. Os valores médios obtidos estão resumidos na Tabela 7. A concentração do DNA mitocondrial e componente menor são respectivamente iguais a 26 e 16 $\mu\text{g/ml}$.

ver presente, o Cot necessário para 50% de renaturação da família é reduzido na proporção do grau de repetição. Nessas condições, quando se estuda a reassociação de DNA não fracionado, a equação (1) deve ser modificada e a frequência de repetição (x_i) de um DNA rapidamente renaturado pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$Cot_{1/2} = \frac{G}{K x_i} \quad (2)$$

Portanto, para calcular a frequência de repetição, deve-se conhecer o genoma do organismo em estudo.

A equação (2) contém as relações necessárias para a interpretação de medidas de velocidade de reassociação de DNA repetido. Se uma família de sequências repetidas está contida em uma fração α do DNA total, a concentração efetiva muda e a equação (1) não pode ser aplicada. Nesse caso, o $Cot_{1/2}$ para uma determinada família de DNA reiterado deve ser multiplicada pela fração que ela representa do DNA total (α). A complexidade cinética (N) da família é obtida pela equação:

$$N = Cot_{1/2} \alpha K \quad (3)$$

Conhecendo-se α e N , pode-se calcular a frequência de repetição do DNA rapidamente reassociado:

$$x_i = \frac{\alpha G}{N} \quad (4)$$

A reação de reassociação do DNA de E. coli (Figura 20) segue uma curva sigmóide com inclinação característica para uma reação homogênea de segunda ordem. A determinação do $Cot_{1/2}$ desse DNA fornece um ponto de calibração adequado, conforme discutido acima. Por outro lado, a heterogeneidade cinética do DNA total, verificada nos gráficos (Figura 16) segundo Wetmur e Davidson (1968), é claramente confirmada pela curva de reassociação ilustrada na figura 20.

O DNA nuclear apresenta uma cinética de

renaturação (Figura 20) característica para sequências que aparecem uma única vez no genoma, apresentando baixa porcentagem de renaturação no intervalo de valores de Cot empregados (cerca de 10%). A reação de reassociação obedece cinética de segunda ordem como pode ser observado pelos dois conjuntos de pontos mostrados na figura 20.

Tabela 7 - Propriedades cinéticas das frações de DNA reiterado de trofozoitos de A. castellanii

DNA	$Cot_{1/2}$ observado	Complexidade cinética (daltons)	Frequência de reite- ração
componente menor	0,011	$1,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^3$
	0,11	$2,4 \times 10^7$	$2,8 \times 10^2$
	0,70	$2,8 \times 10^8$	45
mitocondrial	0,08	$1,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^2$
	0,60	$2,4 \times 10^8$	52

A renaturação (NaCl 1 M, 60°C), foi analisada pela queda de absorbância a 260nm. Os valores médios (3 determinações) de complexidade cinética e frequência de reiteração foram calculados conforme sugerido por Britten e Kohne (1967), por comparação com o $Cot_{1/2}$ do DNA de E. coli (0,5), com genoma igual a $2,7 \times 10^9$ d (Cairns, 1963). $Cot_{1/2}$ é o produto da concentração de DNA (moles de nucleotídeos/l), pelo tempo (segundos) necessário para 50% de reassociação.

A análise da curva de reassociação do componente menor do DNA total (Figura 21), indica considerável heterogeneidade no grau de repetição das sequências de nucleotídeos. Pode-se distinguir três frações, com características mostradas na Tabela 7. A complexida

de cinética e frequência de reiteração de cada fração foram calculadas conforme descrito acima, por comparação com os dados obtidos para o DNA de E. coli, renaturado nas mesmas condições. A renaturação do DNA de E. coli e do componente menor resultam na recuperação de aproximadamente 80 e 50% da hipocromicidade inicial respectivamente.

O perfil de renaturação do DNA mitocondrial (Figura 21), mostra a existência de duas frações com complexidade cinética e frequência de reiteração semelhantes às frações do componente menor com velocidade de renaturação "intermediária" e "lenta" (Tabela 7). A porcentagem média de renaturação do DNA mitocondrial é igual a 40%.

VII. Discussão

1. Isolamento de núcleos

Vários métodos para extração de núcleos, utilizando meios aquosos de homogenização (ver Métodos), foram testados, sem obtenção de resultados satisfatórios. O procedimento descrito (Métodos), permitiu o isolamento de núcleos com baixa contaminação por material citoplasmático ou células inteiras (Figura 2). Os núcleos isolados eram, aparentemente, intactos (Figura 3a), mantendo a subestrutura nuclear observada "in vivo" (Figura 3b). O método empregado proporcionava resultados reprodutíveis, conforme pode ser julgado pelos valores de desvio padrão obtidos na determinação da composição química de diferentes preparações (Tabela 2).

A demonstração da atividade de RNA polimerase (E.C.2.7.7.6), mostrou que os núcleos, além de estruturalmente intactos, eram fisiologicamente ativos. A reação catalisada pela enzima nuclear era DNA-dependente, conforme demonstrado pelo efeito da adição de actinomicina D (Tabela 3). Rudick e Weisman (1973a), demonstraram que trofozoitos de A. castellanii apresentam duas atividades distintas de RNA polimerase-DNA-dependente, fração I e II, sendo que ambas requerem magnésio e manganês para atividade máxima. A fração I era inibida por cicloheximida e a fração II por rifampicina e α -amanitina. A inibição da fração II por rifampicina só era obtida com altas concentrações da droga (200 $\mu\text{g/ml}$), ao contrário do que acontece em Amoeba proteus, onde 70% da síntese de RNA é inibida por concentrações da ordem de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Tautvydas, 1971). Os resultados aqui descritos (Tabela 3), indicam que núcleos isolados de A. castellanii, apresentam atividade de RNA polimerase-DNA-dependente, que não é inibida por rifampicina na concentração testada (8 $\mu\text{g/ml}$).

As micrografias eletrônicas (Figura 3) , mostram que o processo de isolamento não remove a membrana nuclear externa com ribossomos aderidos, que poderiam ser considerados como uma forma de contaminação citoplasmática. A membrana nuclear externa pode ser removida opcionalmente (Blobel e Potter, 1966). Todavia, esse procedimento apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas em cada caso específico. Para os objetivos do trabalho aqui descrito, a remoção de traços do retículo endoplasmático das preparações de núcleos foi considerada irrelevante.

A análise de ácidos nucleicos em protozoários é dificuldade pelo fato de que poucas espécies são cultiváveis axênicamente (Mandel, 1967). O número de espécies examinadas é pequeno e pouco representativo, especialmente no caso das amebas. Os resultados de composição química de núcleos isolados de A. castellanii (Tabela 2), mostram que as razões RNA/DNA e proteína/DNA são muito próximas das razões determinadas para núcleos de fígado de rato (Blobel e Potter, 1966) e significantemente diferentes das descritas para levedo (Rozijn e Tonino, 1964) e A. proteus (Tautvydas, 1971). Em A. castellanii, o teor médio de DNA por núcleo, foi avaliado em 10,6 pg (Resultados, item 4) . Esse valor é intermediário entre os valores de 3,5 e 13,6 pg, determinados, respectivamente, para Euglena gracilis (Mandel, 1967) e Tetrahymena pyriformis (Mandel, 1967), mas, sem dúvida muito menor que os dados para as amebas gigantes, como A. proteus (Tautvydas, 1971) e Paramecium aurelia (Isaacks et al., 1973), respectivamente iguais a 34 e 51,2 pg por núcleo. Deve-se levar em consideração que o conteúdo de DNA por núcleo obtido pela análise química de núcleos isolados, representa um valor médio (Mirsky e Ris, 1951). A comparação desses valores médios demonstra o grau de heterogeneidade existente entre microrganismos eucariotos, no que se refere ao conteúdo de DNA por núcleo.

2. Extração de DNA

Vários autores (Kirtikar et al., 1967 ;

Mandel, 1967; Adam et al., 1969), encontraram dificuldades na extração de DNA de A. castellanii e de outras amebas. O procedimento adotado (Métodos) é uma combinação dos métodos de Kirby (1962) e Adam et al. (1969) descritos, respectivamente, para extração de DNA de ovos de Drosophila e DNA celular total de trofozoitos de A. castellanii. Ao contrário do método de Adam et al. (1969), o DNA é obtido a partir da fase aquosa da extração com fenol. A metodologia adotada permite a recuperação de grandes quantidades de DNA altamente polimerizado, com peso molecular uniforme, conforme avaliado pelas bandas estreitas obtidas em gradientes de densidade. O DNA obtido era constituído por moléculas nativas que, quando desnaturadas, apresentavam o efeito hipercrômico esperado. Além disso, os valores de peso molecular obtidos em gradientes de sacarose neutros e alcalinos, indicavam ausência significativa de quebras em uma única fita de DNA. O espectro de absorção (Figura 5), apresentava razões de absorbância características de DNA puro (Marmur, 1961).

3. Caracterização do DNA de trofozoitos

a) DNA total

O DNA celular total de trofozoitos é constituído por dois componentes com densidade de flutuação igual a $1,717 \text{ g/cm}^3$ (componente maior) e $1,692 \text{ g/cm}^3$ (componente menor). A contribuição de cada componente é respectivamente igual a 84% e 16%, conforme avaliado a partir do traçado fotoelétrico de DNA total centrifugado em gradientes de CsCl. Um outro satélite menos denso ($\rho = 1,670 \text{ g/cm}^3$), foi observado em algumas preparações de DNA total que, quando centrifugadas em gradientes preparativos de CsCl, apresentavam uma banda muito nítida e opalescente na região de equilíbrio do DNA. Os resultados obtidos quanto à caracterização desse material, indicam que ele seja constituído por glicogênio, já que apresenta teste positivo com o reagente de antrona, sensibilidade à digestão por α -amilase,

densidade de flutuação semelhante à de glicogênio comercial (cf. Mandel et al., 1968), precipitação com etanol e natureza não-dializável. Apesar de não apresentar absorção máxima na região ultra-violeta do espectro, o polissacarídeo causa dispersão de luz suficiente para afetar o espectro de absorção das preparações de DNA (Figura 5). Conclusões semelhantes foram relatadas por outros autores, que verificaram a presença de bandas satélites de glicogênio (Brunk e Hanawalt, 1966) ou de outros polissacarídios (cf. Mandel et al., 1968), em gradientes isopícnicos de CsCl. Portanto, componentes desse tipo devem ser analisados com cuidado, para que não possam ser interpretados, erroneamente, como satélites de DNA ricos em AT (Rosenkranz e Carden, III, 1967).

A análise da incorporação de timidina-³H em material ácido-insolúvel (não descrita neste trabalho), demonstra que a velocidade de síntese de DNA diminui muito durante a fase estacionária, conforme verificado anteriormente por Rudick (1971). Entretanto, a síntese dos dois componentes parece ser afetada diferencialmente. A proporção do componente menor varia sensivelmente ao longo da curva de crescimento, apresentando um valor máximo de 16% do DNA celular total na fase log mediana (Tabela 4). Fenômeno semelhante foi descrito para o DNA mitocondrial de levedo (Moustachi e Williamson, 1966), apesar de existirem controvérsias a esse respeito (Fukuhara, 1969). A porcentagem do componente menor no DNA de cistos (7%) é semelhante ao valor apresentado por culturas em fim de fase log (6%), quando se inicia o encistamento em massa das células. A redução da proporção do componente menor no DNA de cisto poderia, pelo menos em parte, ser atribuída à autólise de mitocôndrias, que são incorporadas em autolisssomos durante o encistamento (Bowers e Korn, 1969). A atribuição de um significado funcional à variação da proporção do componente menor é dificultada pela existência de diferentes frações de DNA com densidade média igual a 1,692 g/cm³. Para efeito de padronização, todas as experiências aqui descritas, empregam DNA ex-

traído de células em fase log mediana.

A renaturação do DNA total de trofozoitos apresenta características cinéticas comuns à maioria dos eucariotos estudados (Britten e Kohne, 1967). A curva de reassociação se estende por várias unidades de log de Cot, sugerindo a existência de vários componentes com diferentes velocidades de reassociação (Figura 20). A distinção entre as diferentes famílias é dificultada pelos valores semelhantes das velocidades de reassociação. Foi possível obter uma aproximação através da aplicação da equação (2), (item 9, Resultados), para calcular o valor de $Cot_{1/2}$ correspondente a vários graus de reiteração. Quando uma escala desses valores é marcada no diagrama de log de Cot (Figura 20), obtém-se a delimitação do intervalo de frequências de repetição existentes. O perfil de reassociação obtido nas condições de incubação adotadas (NaCl 1M; 60°C), sugere que 14% do DNA seja constituído por sequências com frequência média de reiteração igual a 100. Estudo da cinética de reassociação das frações isoladas fornece uma visão mais detalhada do espectro de sequências repetidas do DNA total.

b) DNA nuclear e componente maior

A comparação entre os resultados obtidos com o componente maior do DNA total e DNA isolado de núcleos de trofozoito (Tabelas 5 e 6), demonstram a identidade entre essas duas espécies de DNA.

O alto grau de homogeneidade das sequências de bases do DNA nuclear é claramente evidenciado pelo comportamento em gradientes de CsCl, desnaturação térmica e renaturação. O perfil de fusão é caracterizado por uma transição abrupta, mostrando um pico gaussiano nas curvas derivadas de desnaturação (Figura 14). Não foram observados satélites em gradientes de CsCl de DNA nuclear nativo ou fragmentado, obtendo-se sempre, apenas uma banda estreita (Figura 9A). O DNA é cineticamente homogêneo, apresentando uma única reta em gráficos do tipo sugerido por Wetmur e Davidson

(1968) (Figura 18). Assim sendo, a proporção de sequências reiteradas no DNA nuclear é muito reduzida e a maior parte das sequências do DNA total com renaturação rápida deve ter localização citoplasmática. O DNA nuclear seria composto principalmente por sequências únicas que renaturam com um k_2 igual a $0,106 \text{ l.mol}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, que corresponde a uma complexidade cinética de $1,46 \times 10^{11} \text{ d}$. A complexidade analítica do DNA nuclear, determinada por análise química de núcleos isolados (10,6 pg de DNA/núcleo), apesar de ser um valor médio, aproxima-se da complexidade determinada por métodos cinéticos ($1,46 \times 10^{11} \text{ d}$). A discrepância entre esses valores poderia indicar a presença de uma pequena quantidade de sequências reiteradas no genoma nuclear, não detectadas pelas técnicas e condições de renaturação empregadas. Realmente, uma certa porcentagem de sequências com repetição intermediária deve estar presente no DNA nuclear, já que na maioria dos eucariotos estudados, sequências desse tipo parecem estar dispersas ao longo do genoma (Britten e Smith, 1970). Em protozoários, a informação existente é muito escassa, e a ameba representaria um exemplo de eucarioto com proporção muito baixa de sequências reiteradas com localização nuclear.

A proporção de DNA nuclear (86%) obtida por extrapolação a tempo zero de reação (Wetmur, 1967; Wells e Birnstiel, 1969), em gráficos lineares de renaturação (Figura 16), concorda estreitamente com o valor obtido a partir da área das curvas de sedimentação em gradientes analíticos de CsCl (84%, Figura 9B).

Os gráficos de renaturação construídos segundo Britten e Kohne (1967), mostram que não há contaminação de DNA nuclear com DNA repetido (Figura 20), confirmando o perfil unimodal observado em gradientes de densidade (Figura 9A).

c) DNA mitocondrial e componente menor

O DNA extraído da fração mitocondrial apresenta densidade de flutuação idêntica à do componente menor do DNA total ($1,692 \text{ g/cm}^3$). As mitocôndrias

não foram tratadas com DNase e o DNA mitocondrial estava consideravelmente contaminado por DNA nuclear (Figura 10A). Todavia, purificação por centrifugação em gradientes de CsCl, resultou em grande redução da contaminação por DNA nuclear (Figura 10B), representada por moléculas altamente degradadas, conforme mostrado pelo perfil largo e achatado na região de densidade igual a $1,717 \text{ g/cm}^3$. Bohnert (1973) obteve resultados semelhantes, verificando um enriquecimento do componente menor em preparações mitocondriais.

O componente menor do DNA total apresenta uma transição térmica complexa, que sugere uma análise mais detalhada, através da primeira derivada das curvas de fusão (Figura 15A). A transição térmica é excepcionalmente larga e assimétrica. A característica marcante é que essas curvas não apresentam uma distribuição gaussiana, ao contrário do DNA nuclear. A análise dessas curvas mostra um componente principal com T_m em torno de 62°C e dois componentes de menor importância com T_m de 65 e 75°C aproximadamente. A presença de um componente com T_m semelhante a 75°C , poderia indicar contaminação por DNA nuclear. Todavia, as preparações de componente menor, quando centrifugadas em gradientes de CsCl, apresentavam um único pico estreito, com densidade igual a $1,692 \text{ g/cm}^3$. Adam e colaboradores (1969) também observaram a presença, no componente menor, de uma espécie de DNA com T_m semelhante ao do DNA nuclear.

A curva de desnaturação do componente menor reflete a presença de segmentos de DNA com composições médias de bases bastante diferentes. É provável que a heterogeneidade seja intramolecular e não intermolecular, conforme sugerido pela banda única e simétrica observada em gradientes de CsCl. Essa interpretação (Bernardi et al., 1970), explica a diferença entre os valores de porcentagem de GC calculados a partir do T_m e densidade de flutuação do componente menor do DNA total (Tabela 5). Não foi feita uma análise exaustiva do perfil de fusão do DNA mitocondrial que, todavia, também apresenta características compatíveis com uma com-

posição heterogênea. A heterogeneidade de composição de bases não é muito comum em organismos eucariotos do tipo selvagem, apesar de ter sido descrita para DNA de cloroplastos de Chlamydomonas (Wells e Sager, 1971), DNA de cinetoplastos de Trypanosoma cruzi (Riou e Paolletti, 1967) e DNA mitocondrial de algumas linhagens "petite" de levedo (Bernardi et al., 1970). O arranjo das frações com diferentes razões de bases no DNA mitocondrial, pode ser extrapolado a partir das curvas derivadas de desnaturação e perfil de sedimentação em gradientes de CsCl. Se essas regiões fôsssem muito distanciadas, o perfil obtido após centrifugação isopícnica seria constituído por várias bandas, ou, pelo menos, por uma banda muito alargada. Todavia, obtinha-se sempre, uma única banda, caracterizada pela largura esperada segundo o tamanho do DNA utilizado (Vinograd e Hearst, 1962). Os resultados, portanto, sugerem que essas regiões heterogêneas são pequenas e dispersas ao longo do genoma (Wells e Sager, 1971).

Conforme discutido anteriormente (item 9 de Resultados), é possível avaliar o conteúdo informacional (complexidade de sequência) de um DNA, através de estudos de cinética de renaturação. Os cálculos serão simples somente se o DNA em questão apresentar comportamento homogêneo como o DNA nuclear ou o DNA de E. coli, que serviu de padrão nas experiências de reassociação. No caso do componente menor ou DNA de mitocôndrias que se comportaram heterogêneamente, a avaliação da complexidade a partir da determinação das constantes de velocidade é prejudicada pela renaturação precoce das famílias de DNA reiterado. Além disso, quando uma família de sequências repetidas é isolada do resto do DNA, ela reassocia mais rapidamente, em virtude do aumento relativo na sua concentração. Nesse caso, o $Cot_{1/2}$ observado nos gráficos de log de Cot , devem ser multiplicados pela fração do DNA original representada pela família de sequências repetidas, obtendo-se o valor de $Cot_{1/2}$ "puro" (Firtel e Bonner, 1972), ou seja, o $Cot_{1/2}$ que seria obtido se o DNA fôsse constituído somente pela fração em estudo. As tabelas 6 e 7 resumem os resultados de cinética de

reassociação de várias frações de DNA, levando-se em consideração as limitações discutidas. Os resultados obtidos indicam que o DNA reiterado de trofozoitos apresenta três famílias distintas, definidas por frequências médias de reiteração características para famílias com renaturação "rápida" (3×10^3), "intermediária" (3×10^2) e "lenta" (50). O número de famílias com diferentes velocidades de renaturação encontradas no DNA mitocondrial e componente menor, corroboram a existência de três famílias de sequências reiteradas sugeridas pelo perfil de renaturação do DNA total (Figura 16). Além disso, os valores de frequência de reiteração das famílias presentes no DNA mitocondrial e componente menor (Tabela 7), situam-se dentro do intervalo de frequência das sequências reiteradas do DNA total, calculado a partir da complexidade do DNA nuclear (ver escala de valores de $Cot_{1/2}$ calculados segundo diferentes graus de reiteração na Figura 20).

A comparação entre os valores de complexidade cinética e frequência de reiteração (Tabela 7) e k_2 aparente (Tabela 6), sugere que o DNA mitocondrial contém as famílias com renaturação "intermediária" e "lenta", enquanto que a fração "rápida" deve ter origem citoplasmática extramitocondrial.

Assim, o DNA mitocondrial seria constituído por um componente principal com velocidade de renaturação compatível com uma complexidade cinética de $2,6 \times 10^8$ d (fração "lenta") e por outro componente com genoma próximo de $2,1 \times 10^7$ d (fração "intermediária"), que representa 35% do genoma mitocondrial, conforme estimado a partir da hipocromicidade devida a cada fração (Wetmur, 1967). Bohnert (1973), demonstrou que 35% do DNA mitocondrial era formado por círculos abertos, com um contorno médio de 12,8 μ m, que correspondem a um PM de $2,77 \times 10^7$ d, valor esse comparável à complexidade cinética do componente mais rápido do DNA mitocondrial ($2,1 \times 10^7$ d). Portanto, é provável que as moléculas analisadas ao microscópio eletrônico representem as sequências de bases detectadas nas experiências de renaturação aqui descritas. Adicionalmen -

te, Bohnert (1973) descreveu a existência de moléculas circulares maiores, moléculas lineares e moléculas colabadas cujo comprimento não pode ser medido, o que impede a comparação com os resultados cinéticos.

A fração intermediária corresponde a 6×10^9 d (4% do genoma da ameba), enquanto que a fração lenta equivale a $1,3 \times 10^{10}$ d (7,5% do genoma). A diferença entre a complexidade analítica e a complexidade cinética indicaria, então, que os componentes do DNA mitocondrial estariam presentes, respectivamente, em cerca de 300 e 50 cópias por genoma nuclear.

O DNA mitocondrial de A. castellanii, como acontece em outros microrganismos eucariotos estudados, é constituído por moléculas maiores que o DNA mitocondrial de células de animais vertebrados (Sager, 1972). Os dados obtidos são semelhantes aos valores de tamanho e conteúdo informacional determinados para DNA de cloroplastos de algas e plantas superiores e DNA mitocondrial de plantas superiores (Sager, 1972). O comportamento cinético heterogêneo mostrado pelo DNA mitocondrial de A. castellanii, foi igualmente verificado em DNAs citoplasmáticos de mitocôndrias (Wells e Birnstiel, 1969) e cloroplastos (Wells e Birnstiel, 1969 ; Wells e Sager, 1971), que apresentavam um componente com renaturação rápida, presente em muitas cópias e um componente principal caracterizado por uma frequência de reiteração menor.

A análise das tabelas 6 e 7, sugere que o componente menor do DNA total, de localização citoplasmática, contém uma fração de DNA de origem extramitocondrial, presente em aproximadamente 3×10^3 cópias. Esse DNA poderia ser análogo, em células superiores, aos episômos bacterianos, ou então, demonstraria a existência de organismos simbiotes, sugerida anteriormente por Ito et al. (1969). Esses autores postularam que os corpúsculos citoplasmáticos contendo DNA, identificados por autoradiografia, seriam constituídos por vírus defectivos ou episômos. A complexidade cinética determinada para a fração rápida do DNA da ameba ($1,5 \times 10^6$ d), exclui a possibilidade de que os simbiotes possam ser

bactérias ou micoplasmas, concordando com as observações citológicas anteriores (Ito et al., 1969). A natureza extracromossomal desse DNA sugere que uma pequena fração do genoma (2,5%), não estaria submetida ao controle de replicação normal, formando múltiplas cópias, cada vez que o genoma da ameba sofresse duplicação. A autonomia genética dessas partículas seria melhor evidenciada, através da determinação do grau de multiplicidade em diferentes estágios de crescimento de culturas de amebas (Chiscon e Kohne, 1970). Qualquer que seja a origem filogenética dessas partículas, elas poderiam representar outro exemplo de um fenômeno comum entre os protozoários; conforme discutido por Soldo e Godoy (1973), que salientam a vantagem seletiva da existência de muitas cópias para a manutenção da continuidade genética em um ambiente intracelular.

Por outro lado, a existência de um DNA citoplasmático extramitocondrial poderia ser relacionada com a extrusão de DNA nuclear para o citoplasma, descrita anteriormente (Bowers e Korn, 1969). A natureza e destino do DNA liberado são desconhecidos. A caracterização desse DNA poderia fornecer resultados interessantes, já que fenômenos semelhantes foram verificados apenas durante a meiose, envolvendo sempre a amplificação de cistrons ribossômicos (Lima-de-Faria, 1973). Se o DNA citoplasmático, detectado nas experiências de renaturação fôsse de origem nuclear, dificilmente conteria informação para a síntese de rRNA, já que os cistrons ribossômicos, na maioria dos eucariotos estudados, têm densidade de flutuação maior que a do DNA nuclear (Birnstiel et al., 1971). Sem dúvida, a atribuição de uma função à fração rápida do DNA total de A. castellanii, requer maior investigação.

4. Análise das condições de renaturação

O grau de precisão de pareamento das sequências de nucleotídeos é determinado pelas condições de incubação, ou seja, o tamanho da fração de DNA que reassocia, varia com o "critério" estabelecido durante a

experiência realizada para estudar esse DNA. Como a re-
 associação é acelerada em soluções de alta força iônica
 (Wetmur e Davidson, 1968), adotou-se, rotineiramente,
 NaCl 1 M como meio de incubação e temperatura i-
 gual a 60°C. Segundo Rice e Paul (1972), essas condi-
 ções de incubação evitam a formação de híbridos instá-
 veis e não específicos, apesar de constituírem um cri-
 tério não muito rígido de renaturação. A adoção de tem-
 peratura mais alta ou força iônica mais baixa durante
 a renaturação, determinariam a formação de moléculas du-
 plas, contendo menor proporção de bases mal pareadas.
 Todavia, experiências de renaturação empregando DNA
 dissolvido em SSC, forneceram resultados idênticos aos
 descritos neste trabalho, possibilitando a conclusão de
 que as regiões de homologia detectadas eram relativamen-
 te extensas.

As condições de incubação adotadas permiti-
 ram evidenciar a heterogeneidade de sequências de ba-
 ses do DNA mitocondrial de A. castellanii, evidenciada
 pelas características do perfil de renaturação e desna-
 turação térmica. Estudos mais detalhados das curvas de
 fusão, permitirão estabelecer uma possível correlação
 entre as regiões de heterogeneidade local observadas na
 desnaturação e as famílias com diferentes velocidades
 de renaturação.

Entretanto, a complexidade cinética das
 famílias de DNA reiterado deve ser interpretada crítica-
 mente, já que o "critério" adotado permite a reassocia-
 ção de sequências semelhantes, mas não idênticas, que
 poderiam reduzir a velocidade de reassociação (Britten
 e Bonner, 1971), fornecendo uma medida aumentada do
 comprimento das sequências que se repetem (Southern,
 1970). Deve-se, também, levar em consideração que as
 moléculas de DNA reassociado poderiam conter regiões
 não pareadas (Britten e Kohne, 1967), se as sequências
 repetidas ocorressem em segmentos de DNA muito meno-
 res que os fragmentos de DNA utilizados nas experiên-
 cias (Tabela 6).

O tamanho dos fragmentos de DNA e os va-
 lores relativamente baixos de Cot empregados, não per-

mitem excluir a existência de uma pequena porcentagem de DNA único no genoma mitocondrial, nem a presença de uma baixa porcentagem de sequências reiteradas no DNA nuclear.

As constantes de segunda ordem obtidas não foram corrigidas quanto ao teor de GC, porque há evidências contraditórias sobre o seu efeito (Wetmur e Davidson, 1968; Gillis et al., 1970). Além disso, no caso do DNA mitocondrial e componente menor, a heterogeneidade de composição de bases impossibilitaria essa correção.

Em resumo, as medidas de frequência e proporção de DNA "único" e reiterado de A. castellanii, representam um número mínimo de componentes do genoma, já que a família de reiteração intermediária poderia conter outros componentes não individualizados através de estudos de cinética de reassociação.

VIII. Resumo

O trabalho descreve um método para isolamento de núcleos morfologicamente intactos e fisiologicamente ativos, além da caracterização parcial do DNA de Acanthamoeba castellanii (linhagem Neff).

O DNA celular total de trofozoitos contém quatro famílias com diferentes velocidades de renaturação. A fração com renaturação mais lenta (DNA "único"), corresponde ao DNA nuclear (86% do genoma) e apresenta características cinéticas compatíveis com uma complexidade de sequência igual a $1,46 \times 10^{11}$ daltons. O DNA reiterado (14% do genoma), compreende três famílias de sequências de nucleotídeos, denominadas "rápida", "intermediária" e "lenta", com complexidade cinética respectivamente igual a $1,5 \times 10^6$; $2,1 \times 10^7$ e $2,6 \times 10^8$ daltons, presentes em aproximadamente 3×10^3 , 3×10^2 e 50 cópias. As famílias de DNA reiterado têm localização predominantemente citoplasmática, sendo que as famílias "intermediárias" e "lenta" fazem parte do genoma mitocondrial. O comportamento cinético heterogêneo do DNA mitocondrial e sua complexidade assemelham-se aos dados existentes para outros microrganismos eucariotos. A constatação de uma espécie de DNA extramitocondrial pode ser relacionada com a descrição anterior de corpúsculos citoplasmáticos contendo DNA ou com a extrusão de cromatina para o citoplasma, verificada no início do encistamento.

O DNA de trofozoitos também foi caracterizado quanto ao padrão de sedimentação em gradientes de densidade, desnaturação térmica e composição de bases. O DNA celular total apresenta dois componentes em gradientes de CsCl, caracterizados por densidade de flutuação iguais a $1,717 \text{ g/cm}^3$ (componente maior) e $1,692 \text{ g/cm}^3$ (componente menor). O perfil de fusão do DNA mitocondrial sugere heterogeneidade de composição de bases.

IX. Bibliografia

1. Adam, K.M.G. (1959) - "The growth of Acanthamoeba sp. in a chemically defined medium". - J. Gen. Microbiol. 21, 519-529.
2. Adam, K.M.G. (1964) - "A comparative study of Hartmannellid amoebae". - J. Protozool. 11, 423-430.
3. Adam, K.M.G.; Blewett, D.A. e Flamm, W.G. (1969) - "The DNA of Acanthamoeba sp.; a method for its characterization". - J. Protozool. 16, 6-12.
4. Alberts, B.M. e Doty, P. (1968) - "Characterization of a naturally occurring cross-linked fraction of DNA. I. Nature of cross-linkage". - J. Mol. Biol. 32, 379-403.
5. Armstrong, J.A. e Pereira, M.S. (1967) - "Identification of Ryan virus as an amoeba of the genus Hartmannella". - Brit. Med. J. 1, 212-214.
6. Balsamo, J. (1972) - "Características físicas e funcionais do DNA reiterado de Rhynchosciara americana". - Tese de Doutorado, Instituto de Química, U.S.P., São Paulo.
7. Balsamo, J.; Hierro, J.M. e Lara, F.J.S. (1973) - "Transcription of repetitive DNA sequences in Rhynchosciara salivary glands". - Cell Different. 2, 119-130.
8. Band, R.N. (1959) - "Nutritional and related biological studies on the free-living soil amoeba Hartmannella rhysodes". - J. Gen. Microbiol. 21, 80-95.
9. Band, R.N. (1962) - "The aminoacids requirements of the soil amoeba Hartmannella rhysodes". - J. Protozool. 9, 377-379.

10. Band, P.N. (1963) - "Extrinsic requirements for encystation by the soil amoeba Hartmannella rhyssodes". - J. Protozool. 10, 101-107.
11. Band, R.N. e Machemer, C. (1963) - "Environmental induction of multinucleate Hartmannella rhyssodes". - Exp. Cell Res. 31, 31-38.
12. Band, R.N. e Mohrlok, S. (1973 a) - "Observations on induced amitosis in Acanthamoeba". - Exp. Cell Res. 79, 327-337.
13. Band, R.N. e Mohrlok, S. (1973 b) - "The cell cycle and induced amitosis in Acanthamoeba". - J. Protozool. 20, 654-657.
14. Band, R.N.; Mohrlok, S. e Rubin, R.W. (1970) - "Separate induction of amitotic and mitotic division in Acanthamoeba rhyssodes". - Nature 227, 379-381.
15. Bernardi, G.; Faures, M.; Piperno, G. e Slonimski, P.P. (1970) - "Mitochondrial DNA's from respiratory-sufficient and cytoplasmic respiratory-deficient mutant yeast". - J. Mol. Biol. 48, 23-42.
16. Birnstiel, M.L.; Chipchase, M. e Speirs, J. (1971) - "The ribosomal RNA cistrons". - Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 11, 351-389.
17. Birnstiel, M.L.; Speirs, J.; Purdom, I.; Jones, K. e Loening, E. (1968) - "Properties and compositions of the isolated ribosomal DNA satellite of Xenopus laevis". - Nature 219, 454-463.
18. Bishop, J.O. e Freeman, K.B. (1973) - "DNA sequences neighboring the duck hemoglobin genes". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 707-716.

19. Blobell, G. e Potter, V.R. (1966) - "Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield". - Science 154, 1662-1665.
20. Blumenfeld, M. e Forrest, H.S. (1972) - "Differential under-replication of satellite DNAs during Drosophila development". - Nature New Biol. 239, 170-172.
21. Bohnert, H.J. (1973) - "Circular mitochondrial DNA from Acanthamoeba castellanii (Neff strain)". - Biochim. Biophys. Acta 324, 199-205.
22. Bolton, E.T. (1966) - "Nucleic acid interactions . A molecular approach to the study of genes and their products". - Ca. Res. 26, 1964-1970.
23. Bonner, T.I. (1973) - "Instantaneous binding fractions of DNA". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 72, 204-207.
24. Bowers, B. e Korn, E.D. (1968) - "The fine structure of Acanthamoeba castellanii. I. The trophozoite". - J. Cell Biol. 39, 95-111.
25. Bowers, B. e Korn, E.D. (1969) - "The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment". - J. Cell Biol. 41, 786-805.
26. Bram, S. (1971) - "Secondary structure of DNA depends on base composition". Nature New Biol. 232, 174-176.
27. Bray, G.A. (1960) - "A simple, efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter". - Annal.Biochem. 1, 279-285.
28. Breuer, M.E. e Pavan, C. (1955) - "Behaviour of polytene chromosomes of Rhynchoschiara angelae at different stages of larval development" . - Chromosoma 7, 371-386.

29. Britten, R.J. (1970) - "Observed properties of repeated DNA sequences (april 1969)". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 68, 376-378.
30. Britten, R.J. (1971) - "Sequence complexity, kinetic complexity and genetic complexity". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 69, 503-506.
31. Britten, R.J. e Bonner, T. (1971) - "The effect of sequence divergence on the rate of reassociation". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 70, 373-374.
32. Britten, R.J. e Davidson, E.H. (1969) - "Gene regulation for higher cells: a theory". - Science 165, 349-357.
33. Britten, R.J. e Kohne, D.E. (1967) - "Nucleotide sequence repetition in DNA". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 65, 78-106.
34. Britten, R.J. e Kohne, D.E. (1968) - "Repeated nucleotide sequences". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 66, 73-88.
35. Britten, R.J. e Rake, A.V. (1969) - "Search for saltatory replication". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 67, 325-327.
36. Britten, R.J. e Smith, J. (1970) - "A bovine genome". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 68, 378-386.
37. Britten, R.J. e Smith, J.F. (1971) - "Cattle, sheep, and satellites". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 69, 506-507.
38. Britten, R.J.; Graham, D.E. e Henerey, M. (1972) - "Seaurchin repeated and single-copie DNA". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 71, 270-273.
39. Brown, D.D. e Gurdon, J.B. (1964) - "Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of Xenopus laevis". - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 51, 139-146.

40. Brown, D.D. e Weber, C.S. (1968) - Gene linkage by RNA-DNA hybridization. II. Arrangement of the redundant gene sequences for 28S and 18S ribosomal RNA". - J. Mol. Biol. 34, 681-697.
41. Brown, D.D.; Wensink, P.C. e Jordan, E. (1972) - A comparison of the ribosomal DNA's of Xenopus laevis e Xenopus mulleri: the evolution of tandem genes". - J. Mol. Biol. 63, 57-73.
42. Brunk, C.F. e Hanawalt, P.C. (1966) - "Glycogen satellite bands in isopycnic CsCl gradients". - Exp. Cell Res. 42, 406-408.
43. Burgi, E. e Hershey, A.D. (1963) - "Sedimentation rate as a measure of molecular weight of DNA". - Biophys. J. 3, 309-321.
44. Byers, T.J.; Rudick, V.L. e Rudick, M.J. (1969) - "Cell size, macromolecular composition, nuclear number, oxygen consumption and cyst formation during two growth phases in unagitated cultures of Acanthamoeba castellanii". - J. Protozool. 16, 693-699
45. Callan, H.G. (1967) - "The organization of genetic units in chromosomes". - J. Cell Sci. 2, 1-7.
46. Cairns, J. (1963) - "The chromosome of E. coli". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 43-46.
47. Carter, R.F. (1968) - "Primary amoebic meningoencephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six cases". - J. Path. and Bact. 96, 1-25.
48. Castellani, A. (1930) - "An amoeba growing in cultures of an yeast". - J. Trop. Med. Hyg. 33, 160-188.
49. Ceriotti, G. (1952) - "A microchemical determination of DNA". - J. Biol. Chem. 198, 297-303.

50. Cerva, L. e Novak, K. (1968) - "Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities". - Science, 160, 92.
51. Chambers, J.A. e Thompson, J.E. (1972) - A scanning electron microscopic study of the excystment process of A. castellanii". - Exp. Cell Res. 73, 415-421.
52. Chang, R.S. e Humes, M. (1962) - "The biologic, immunologic and physicochemical characterization of a transmissible agent capable of inducing DNA and thymine degradation in cultured human cells". J. Exp. Med. 115, 937-957.
53. Chang, R.S.; Pan, I. e Rosenau, B.J. (1966) - "On the nature of the lipovirus". - J. Exp. Med. 124, 1153-1166.
54. Chauveau, J.; Moulé, Y. e Rouiller, C. (1956) - "Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition". - Exp. Cell Res. 11, 317-321.
55. Chiscon, J.A. e Kohne, D.E. (1970) - "DNA sequences present as multiple copies in E. coli". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 68, 388-391.
56. Colli, W. e Oishi, M. (1970) - "A procedure for gene purification: the purification of the ribosomal RNA genes of Bacillus subtilis as DNA-RNA hybrids". - J. Mol. Biol. 51, 657-669.
57. Colli, W.; Smith, I. e Oishi, M. (1971) - "Physical linkage between 5S, 16S and 23S ribosomal RNA genes in Bacillus subtilis". - J. Mol. Biol. 56, 117-127.
58. Corneo, G.; Ginelli, E. e Polli, E. (1970) - "Repeated sequences in human DNA". - J. Mol. Biol. 48, 319-327.
59. Crick, F.H. (1971) - "General model for the chromosomes of higher organisms". - Nature 234, 25-27.

60. Crippa, M.; Meza, I. e Dina, D. (1973) - "Sequence arrangement in mRNA: presence of poly (A) and identification of a repetitive fragment at the 5' end". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 933-942.
61. Crouse, H. e Keyl, H.G. (1968) - "Extra replications in the "DNA puffs" of Sciara coprophila". - Chromosoma 25, 357-364.
62. Culbertson, C.G.; Smith, J.W. e Minner, J.R. (1958) - "Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity". - Science 127, 1506.
63. Culbertson, C.G.; Smith, J.W.; Cohen, H.K. e Minner, J.R. (1959) - "Experimental infection of mice and monkeys with Acanthamoeba". - Am. J. Path. 35, 187-193.
64. Davidson, E.H.; Hough, B.R.; Amenson, C.S. e Britten R.J. (1973) - "General interdispersion of repetitive with non-repetitive sequence elements in the DNA of Xenopus". - J. Mol. Biol. 77, 1-23.
65. di Mauro, E.; Snyder, L.; Marino, P.; Lamberti, A.; Coppo, A. e Tocchini-Valentini, G.P. (1969) - "Rifampicin sensitivity of the components of DNA-dependent RNA polymerase". - Nature 222, 533-537.
66. Dische, Z. (1955) - "Color reactions of nucleic acids components". - The Nucleic acids I, 285; Ed.; Chargaff, E. e Davidson, J.N.; Academic Press, N.Y.
67. Douglas, M. (1930) - "Notes on the classification of the amoeba found by Castellani in cultures of a yeast-like fungus". - J. Trop. Med. Hyg. 33, 258-259.
68. Dunnebacke, T.H. e Schuster, F.L. (1971) - "Infectious agent from a free-living soil amoeba, Naegleria gruberi". - Science 174, 516-518.

69. Dunnebacke, T.H. e Williams, R.C. (1967) - "A re - interpretation of the nature of "lipovirus" cytopathogenicity". - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 57, 1363-1370.
70. Eigner, J. e Doty, P. (1965) - "The native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid". - J. Mol. Biol. 12, 549-580.
71. Firtel, R.A. e Bonner, J. (1972) - "Characterization of the genome of the cellular slime-mold Dictyostelium discoideum". - J. Mol. Biol. 66, 339-361.
72. Firtel, R.A.; Jacobson, A. e Lodish, H.F. (1972) - "Isolation and hybridization kinetics of messenger RNA from the cellular slime-mold Dictyostelium discoideum". - Nature New Biol. 239, 225 - 228.
73. Flamm, W.G.; Walker, P.M.B. e McCallum, M. (1969)- "Some properties of the single strands isolated from the DNA of the nuclear satellite of the mouse (Mus musculus)". - J. Mol. Biol. 40, 423-443.
74. Fukuohara, H. (1969) - "Relative proportions of mitochondrial and nuclear DNA in yeast under various conditions of growth". - Eur. J. Biochem. 11, 135-139.
75. Gall, J.G.; Cohen, E.H. e Atherton, D.D. (1973) - "The satellite DNAs of Drosophila virilis". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 417-421.
76. Gall, J.C.; Cohen, E.H. e Polan, M.L. (1971) - "Repetitive DNA sequences in Drosophila". - Chromosoma 33, 319-344.
77. Gall, J.G.; MacGregor, H.C. e Kidston, M.E. (1969)- "Gene amplification in the cocytes of Dytiscid water beetles". - Chromosoma 26, 169-187.

78. Gambarini, A.G. (1972) - "Estudos sobre os genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em Rhynchosciara". - Tese de Doutorado, Instituto de Química, U.S.P., São Paulo.
79. Gelderman, A.H.; Rake, A.V. e Britten, R. J. (1972) - "Transcription of nonrepeated DNA in neonatal and fetal mice". - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 68, 172-176.
80. Georgiev, G.P. (1969) - "On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells". - J. Theoret. Biol. 25, 473-490.
81. Giles, K.W. e Myers, A. (1965) - "An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid". - Nature 206, 93.
82. Goldstein, L. e Prescott, D.M. (1967) - "Nucleocytoplasmic interactions in the control of nuclear reproduction and other cell cycle stages". - The Control of Nuclear Activity, 3-17; Ed.: Goldstein L., Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
83. Graham, D.E.; Neufeld, B.R. e Britten, R. J. (1973) - "Interspersed of sea-urchin repetitive and nonrepetitive DNA sequences". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 72, 222-224.
84. Griffiths, A.J. e Hughes, D.E. (1968) - "Starvation and encystment of a soil amoeba Hartmanella castellanii". - J. Protozool. 15, 673-677.
85. Griffiths, A.J. e Hughes, D.E. (1969) - "The physiology of encystment of Hartmanella castellanii". J. Protozool. 16, 93-99.
86. Hallberg, R.L. e Brown, D.D. (1969) - "Co-ordinated synthesis of some ribosomal proteins and ribosomal RNA in embryos of Xenopus laevis". - J. Mol. Biol. 46, 393-411.

87. Hennig, W. (1972) - "Highly repetitive DNA sequences in the genome of Drosophila hydei. I. Preferential localization in the X chromosomal heterochromatin". - J. Mol. Biol. 71, 407-417.
88. Hennig, W. e Walker, P.M.B. (1970) - "Variations in the DNA from two rodent families (Cricetidae and Muridae)". - Nature 225, 915-919.
89. Hennig, W.; Hennig, I. e Stein, H. (1970) - "Repeated sequences in the DNA of Drosophila and their localization in giant chromosomes". - Chromosoma 32, 31-63.
90. Hinegardner, R.T.; Rao, B. e Feldman, D.E. (1964)- "The DNA synthetic period during early development of the sea urchin egg". - Exp. Cell Res. 36, 53-61.
91. Hoyer, B.H.; McCarthy, B.J. e Bolton, E.T. (1964)- "A molecular approach in the systematics of higher organisms". - Science 144, 959-967.
92. Hymer, W.C. e Kuff, E.L. (1966) - "Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X-100". - J. Histochem. Cytochem. 12, 359-363.
93. Ifft, J.B.; Voet, D.H. e Vinograd, J. (1961) - "The determination of density distributions and density gradients in binary solutions at equilibrium in the ultracentrifuge". - J. Phys. Chem. 65, 1138-1145.
94. Isaaks, R.E.; Santos, B.G. e Musil, G. (1973) - "Studies on nuclei of Paramecium aurelia. I. Isolation and purification by continuous or discontinuous sucrose gradient centrifugation and biochemical composition". - J. Protozool. 20, 477-481.
95. Ito, S.; Chang, R.S. e Pollard, T.D. (1969) - "Cytoplasmic distribution of DNA in a strain of hartmannellid amoeba". - J. Protozool. 16, 638-645.

96. Jacob, F. e Monod, J. (1963) - "Genetic repression, allosteric inhibition and cellular differentiation". - Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis, 30-64, Ed. Locke, M.; Academic Press, N. Y.
97. Jahnes, W.G.; Fullmer, H.W. e Li, C.P. (1957) - "Free-living amoebae as contaminants on monkey kidney tissue culture". - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96, 484-488.
98. James, T.E. e Byers, T.J. (1967) - "The induction of multinuclearity in agitated and in aging cultures of Acanthamoeba sp. Neff". - J. Cell Physiol. 70, 53-62.
99. Jensen, T. e Dubes, G.R. (1962) - "Cloning, trituration and differentiation of Acanthamoeba sp. by plating". - J. Parasit. 48, 280-286.
100. John, H.A.; Birnstiel, M.L. e Jones, K.W. (1969) - "RNA-DNA hybridization at the cytological level". - Nature 223, 582-587.
101. Jones, K.W. (1970) - "Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells". - Nature 255, 912-915.
102. Jones, K.W. e Robertson, F.W. (1970) - "Localization of nucleotide sequences in Drosophila and mouse by "in situ" hybridization of complementary RNA". - Chromosoma 31, 331-345.
103. Kedes, L.H. e Birnstiel, M.L. (1971) - "Reiteration and clustering of DNA sequences complementary to histone messenger RNA". - Nature New Biol. 230, 165-169.
104. Kirtikar, M.; Jensen, T. e Meyers, D. (1967) - "Extraction of DNA from Acanthamoeba castellanii". - J. Protozool. 14 (suppl.), 11.

105. Kit, S. (1961) - "Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues". - J. Mol. Biol. 3, 711-716.
106. Kohne, D.E. (1969) - "Isolation and characterization of bacterial ribosomal RNA cistrons". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 67, 310-320.
107. Kohne, D.E. (1971) - "Pattern of DNA acquisition during evolution". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 69, 485-488.
108. Kohne, D.E. e Byers, M.J. (1971) - "Studies on the expression, evolution and amplification of DNA sequences". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 70, 376-378.
109. Kohne, D.E.; Chiscon, J.A. e Hoyer, B.H. (1971) - "Nucleotide sequence change in nonrepeated DNA during evolution". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 69, 488-501.
110. Korn, E.D. e Wright, P.L. (1973) - "Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane". - J. Biol. Chem. 248, 439-447.
111. Krishna Murti, C.R. (1971) - "Encystment of amoebae: an example for single cell differentiation". - Current Sci. 40, 589-593.
112. Krishna Murti, C.R. (1973) - "Biochemistry of amoebic encystment". - Biochem. Soc. Transac. 1, 1104.
113. Laird, G.D.; McConaughy, B.L. e McCarthy, B.J. (1969) - "Rate of fixation of nucleotide substitutions in evolution". - Nature 224, 149-154.
114. Lima-de-Faria, A. (1973) - "The molecular organization of the chromomeres of Acheta involved in ribosomal DNA amplification". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 559-571.

115. Liu, C. e Rodina, P. (1966) - "Immunofluorescent studies of human cell cultures and chick embryos inoculated with the ameboid cell "lipovirus complex". - J. Exp. Med. 124, 1167-1178.
116. Loening, U.E.; Jones, K.W. e Birnstiel, M. L. (1969) - "Properties of the ribosomal RNA precursor in Xenopus laevis; comparison to the precursor in mammals and plants". - J. Mol. Biol. 45, 353-366.
117. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A. L. e Randall, R.J. (1951) - "Protein measurements with the Folin-Phenol reagent". - J. Biol. Chem. 193, 265-275.
118. Mandel, M. (1967) - "Nucleic acids of Protozoa". Chemical Zoology I; 541-572; Ed.: Kidder, G.W.; Academic Press, N.Y.
119. Mandel, M. e Marmur, J. (1968) - "Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA". Methods in Enzymology XII B, 195-206; Ed.: Grossman, L. e Moldave, K.; Academic Press. N.Y.
120. Mandel, M.; Schildkraut, C.L. e Marmur, J. (1968) - "Use of CsCl density gradient for determining the guanine plus cytosine content of DNA". - Methods in Enzymology XII B, 184-195; Ed.: Grossman, L. e Moldave, K.; Academic Press, N.Y.
121. Marmur, J. (1961) - "A procedure for the isolation of DNA from microorganisms". - J. Mol. Biol. 3, 208-216.
122. Marmur J. e Doty, P. (1961) - "Thermal renaturation of deoxyribonucleic acid". - J. Mol. Biol. 3, 585-594.

123. Marmur, J.; Rownd, R. e Schildkraut, C.L. (1963) - "Denaturation and renaturation of deoxyribonucleic acid". - Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1. 231-300.
124. Martin, M.A. e Hoyer, B.H. (1966) - "Thermal stabilities and species specificities of reannealed animal DNAs". - Biochemistry 5, 2706-2713.
125. Marzzoco, A. e Colli, W. (1974) - "Isolation of nuclei and characterization of nuclear DNA of Acanthamoeba castellanii". - Biochim. Biophys. Acta (aceito para publicação).
126. Mattar, F.E. e Byers, T.J. (1971) - "Morphological changes and the requirements for macromolecular synthesis during excystment of Acanthamoeba castellanii". - J. Cell Biol. 49, 507-519.
127. Melli, M. e Bishop, J.O. (1969) - "Hybridization between rat liver DNA and complementary RNA". - J. Mo. Biol. 40, 117-136.
128. Melli, M. e Bishop, J.O. (1970) - "Molecular hybridization between rat liver DNA and complementary RNA". - Biochem. J. 120, 225-235.
129. Melli, M.; Whitfield, C.; Rao, K.V.; Richardson, M. e Bishop, J.O. (1971) - "DNA-RNA hybridization in vast DNA excess". - Nature New Biol. 231, 8-12.
130. Meneghini, R.; Armelin, H.A.; Balsamo, J. e Lara, F.J.S. (1971) - "Indication of gene amplification in Rhyncosciara by RNA-DNA hybridization". - J. Cell Biol. 49, 913-916.
131. Mirsky, A.E. e Ris, H. (1951) - "The deoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance". - J. Gen. Physiol. 34, 451-462.

132. Mockrash, L.C. (1954) - "Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent". - J. Biol. Chem. 208, 55-59.
133. Modak, S. (1973) - comunicação pessoal.
134. Moore, A.E. e Hlinka, J. (1968) - "Hartmannella sp. (Acanthamoeba) as a tissue culture contaminant". - J. Nat. Ca. Inst. 40, 569-581.
135. Moustachi, E. e Williamson, D.H. (1966) - "Physiological variations in satellite components of yeast DNA detected by density gradient centrifugation". - Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 56-61.
136. Mukerjee, H. e Goldfeder, A. (1973) - "Purification and properties of ribonucleic acid polymerase from rat liver mitochondria". - Biochemistry 12, 5096-5101.
137. Mulder, C. e Doty, P. (1968) - "Residual activity of denatured transforming DNA of Haemophilus influenzae: naturally occurring cross-linked DNA". - J. Mol. Biol. 32, 425-435.
138. Munro, H.N. e Fleck, A. (1966) - "The determination of nucleic acids". - Methods of Biochemical Analysis 14, 113-176.
139. Neff, R.J. (1957) - "Purification, axenic cultivation and description of a soil amoeba, Acanthamoeba sp.". - J. Protozool. 4, 176-182.
140. Neff, R.J. e Benton, W.F. (1962) - "Localization of cellulose in the cysts of Acanthamoeba sp.". - J. Protozool. 9 (suppl.), 11.
141. Neff, R.J. e Neff, R.H. (1969) - "The biochemistry of amoebic encystment". - Symp. Soc. Exp. Biol. 23, 51-81.

142. Neff, R.J.; Benton, W.F. e Neff, R.H. (1964 a) - "The composition of the mature cyst wall of the soil amoeba Acanthamoeba sp.". - J. Cell Biol. 23, 66 A.
143. Neff, R.J.; Neff, R.H. e Taylor, R.E. (1958) - "The nutrition and metabolism of soil amoeba Acanthamoeba sp.". - Physiol. Zool. 31, 73-91.
144. Neff, R.J.; Ray, S.A.; Benton, W.F. e Wilborn, M. (1964 b) - "Induction of synchronous encystment (differentiation) in Acanthamoeba sp.". - Methods in Cell Physiology 1, 55-83; Ed.: Prescott, D.M.; Academic Press, N.Y.
145. Nygaard, O.F.; Güttles, S. e Rusch, H.P. (1960) - "Nucleic acid metabolism in a slime mold with synchronous mitosis". - Biochim. Biophys. Acta 38, 298-306.
146. Page, F.C. (1967) - "Re-definition of the genus Acanthamoeba with description of three species". - J. Protozool. 14, 709-724.
147. Pardue, M.L. e Gall, J.G. (1969) - "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations". - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 64, 600-604.
148. Pardue, M.L. e Gall, J.G. (1970) - "Chromosomal localization of mouse satellite DNA". - Science 168, 1356-1378.
149. Pardue, M.L.; Brown, D.D. e Birnstiel, M.L. (1973) - "Localization of the genes for 5S ribosomal RNA in Xenopus laevis". - Chromosoma 42, 191-203.
150. Pardue, M.L.; Gerbi, S.S.; Eckhardt, R.A. e Gall, J.G. (1970) - "Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera". - Chromosoma 29, 268-290.

151. Pasternak, J.J.; Thompson, J.E.; Schultz, T.M.G. e Zachariah, K. (1970) - "A scanning electron microscopic study of the encystment of Acanthamoeba castellanii". - Exp. Cell Res. 60, 290-298.
152. Patras, D. e Andujar, J.J. (1966) - "Meningoencephalitis due to Hartmannella (Acanthamoeba)". - Am. J. Clin. Path. 46, 226-233.
153. Paul, J. (1972) - "General theory of chromosome structure and gene activation in eukaryotes" . - Nature 238, 444-446.
154. Paul, J.; Gilmour, R.S.; Affara, N.; Birnie, G. ; Harrison, P.; Hell, A.; Humphries, S.; Windass, J.; e Young, B. (1973) - "The globin gene: structure and expression". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 885-890.
155. Pavan, C. (1965) - "Nucleic acid metabolism in polytene chromosome and the problem of differentiation". - Brook Haven Symp. on Biol. 18, 222-241.
156. Peacock, W.J.; Brutlag, D.; Goldring, E.; Appels, R.; Hinton, C.W. e Lindsley, D.L. (1973) - "The organization of highly repeated sequences in Drosophila melanogaster chromosomes". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 405-416.
157. Potter, J.L. e Weisman, R.A. (1971) - "Differentiation in Acanthamoeba: β -glucan synthesis during encystment". - Biochim. Biophys. Acta 237, 65-74.
158. Prescott, D.M. e Krishna Murti, G. (1973) - "Chromosome structure in ciliated protozoans". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 609-618.
159. Raizada, M.K. e Krishna Murti, C.R. (1971) - "Changes in activity of certain enzymes of Hartmannella (Culbertson strain A-1) during encystment". - J. Protozool. 18, 115-119.

160. Raizada, M.K. e Krishna Murti, C.R. (1972 a) -
 "Transformation of trophic Hartmannella culbertsoni into viable cysts by cyclic 3' , 5' - adenosine monophosphate". - J. Cell Biol. 52, 743-748.
161. Raizada, M.K. e Krishna Murti, C.R. (1972 b) -
 "Synthesis of RNA, protein, cellulose and mucopolysaccharide and changes in the chemical composition of Hartmannella culbertsoni during encystment under axenic conditions". - J. Protozool. 19, 691-695.
162. Ray, D.L. e Hayes, R.E. (1954) - "Hartmannella axtronixis: a new species of free-living ameba. Cytology and life cycle". - J. Morphol. 95, 159.
163. Rice, N. (1971 a) - "Differences in the DNA of closely related rodents". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 70, 366-369.
164. Rice, N. (1971 b) - "Thermal stability of reassociated repeated DNA from rodents". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 69, 472-479.
165. Rice, N. e Paul, P. (1972) - "Reassociation of single-copy DNA sequences". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 71, 262-264.
166. Rice, N. e Straus, N. (1972) - "Evolution of repeated sequences in the genus Mus". - Carnegie Inst. Wash. Year Book 71, 265-269.
167. Riou, G. e Paoletti, C. (1967) - "Preparation and properties of nuclear and satellite deoxyribonucleic acid of Trypanosoma cruzi". - J. Mol. Biol. 28, 377-382.
168. Ritossa, F.M. (1972) - "Procedure for magnification of lethal deletions of genes for ribosomal RNA". - Nature New Biol. 240, 109-111.

169. Ritossa, F.M. e Spiegelman, S. (1965) - "Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of Drosophila melanogaster". - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 53, 737-745.
170. Rosenkranz, H.S. e Carden III, G.A. (1967) - "A non-nucleotide polymer found in the DNA of the sand-dollar Echinarachnius parma. I. Isolation".- Can. J. Biochem. 45, 267-279.
171. Roti Roti, L.W. e Stevens, A.R. (1973) - "DNA synthesis in growth and differentiation of Acanthamoeba castellanii: effects of fluorodeoxyuridine". - Fed. Proc. 32, 616 (abst.).
172. Rozijn, Th. H. e Tonino, G.J.M. (1964) - Study on the yeast nucleus. I. The isolation of nuclei".- Biochim. Biophys. Acta 91, 105-112.
173. Rudick, V.L. (1971) - "Relationships between nucleic acid synthetic patterns and encystment in aging unagitated cultures of Acanthamoeba castellanii". - J. Cell Biol. 49, 498-506.
174. Rudick, V.L. e Weisman, R.A. (1973 a) - "DNA-dependent RNA polymerase from trophozoites and cysts of Acanthamoeba castellanii". - Biochim. Biophys. Acta 299, 91-102.
175. Rudick, V.L. e Weisman, R.A. (1973 b) - "Effect of cycloheximide on RNA polymerase specific activity and encystment in Acanthamoeba castellanii".- Nature 244, 220-222.
176. Rudkin, G.T. (1969) - "Non-replicating DNA in Drosophila". - Genetics (Suppl.) 61, 227-238.
177. Sager, R. (1972) - "Cytoplasmic genes and organelles".; Academic Press, N.Y.
178. Schneider, W.C. e Hogeboom, G.H. (1950) - "Intra-cellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenate". - J. Biol. Chem. 183, 123-128.

179. Sing, B.N. (1949) - "The effect of artificial fertilizers and dung on the numbers of amoebae in Rothamsted soils". - J. Gen. Microbiol. 3, 204-210.
180. Sing, B.N. (1952) - "Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida". - Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B 236, 405-461.
181. Skinner, D.M. e Kerr, M.S. (1971) - "Characterization of mitochondrial and nuclear satellite deoxyribonucleic acids of five species of crustacea". Biochemistry 10, 1864-1872.
182. Soldo, A.T. e Godoy, G.A. (1973) - "Molecular complexity of Paramecium symbiont Lambda DNA : evidence for the presence of a multiple copy genome". - J. Mol. Biol. 73, 93-108.
183. Sorsa, V.; Green, M.M. e Beerman, W. (1973) - "Cytogenetic fine structure and chromosomal localization of the white gene in Drosophila melanogaster". - Nature New Biol. 245, 34-37.
184. Southern, E.M. (1970) - "Base sequence and evolution of guinea-pig α -satellite DNA". - Nature 227, 794-798.
185. Southern, E.M. e Roizes, G. (1973) - "The action of a restriction endonuclease on higher organism DNA". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 429-433.
186. Stark, J.R. (1966) - "Some aspects of carbohydrate metabolism in Hartmannella castellanii". - Biochem J. 100, 24-25 P.
187. Steffensen, D.M. e Wimber, D.E. (1971) - "Localization of tRNA genes in the salivary chromosomes of Drosophila by RNA-DNA hybridization". - Genetics 69, 163-178.

188. Stevens, A.R. e Pachler, P.F. (1973 a) - "RNA synthesis and turnover during density-inhibited growth and encystment of Acanthamoeba castellanii". - J. Cell Biol. 57, 525-537.
189. Stevens, A.R. e Pachler, P.F. (1973 b) - "RNA synthesis in density-inhibited growth and differentiation of Acanthamoeba". - Fed. Proc. 32, 616 (abst.).
190. Stevenson, I. (1967) - "A method for the isolation of macronuclei from Paramecium aurelia". - J. Protozool. 14, 412-414.
191. Studier, F.W. (1965) - "Sedimentation studies of the size and shape of DNA". - J. Mol. Biol. 11, 373-390.
192. Sutton, W.D. e McCallum, M. (1971) - "Mismatching and reassociation rate of mouse satellite DNA". - Nature New Biol. 232, 83-85.
193. Swift, H. (1973) - "The organization of genetic material in eucaryotes: progress and prospects". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 963-979.
194. Tautvydas, K.J. (1971) - "Mass isolated ameba nuclei. I. Isolation procedure and determination of macromolecular composition and RNA polymerase activity". - Exp. Cell. Res. 68, 299-308.
195. Thomas, C.A., Jr. (1970) - "The theory of the master gene". - The Neurosciences: Second study program, p. 973; ed.: Schmitt, F.O.; The Rockefeller Univ. Press, N.Y.
196. Thomas, C.A., Jr.; Hamkalo, B.A.; Misra, D.N. e Lee, G.S. (1970) - "Cyclization of eukariotic deoxyribonucleic acid fragments". - J. Mol. Biol. 51, 621-632.

197. Thomas, C.A., Jr.; Pyeritz, R.E.; Wilson, D. A.; Dancis, B.M.; Lee, C.S.; Bick, M.D.; Huang, H.L.; e Zimm, B.H. (1973) - "Cyclodromes and palindromes in chromosomes". - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 353-370.
198. Thrower, K.J. e Peacocke, A.R. (1968) - "Kinetic and spectrophotometric studies on the renaturation of DNA". - Biochem. J. 109, 543-557.
199. Tomlinson, G. (1967) - "The glyoxylate pathway in Acanthamoeba sp". - J. Protozool. 14, 114-116.
200. Tomlinson, G. e Jones, E.A. (1962) - "Isolation of cellulose from the cyst walls of a soil amoeba". - Biochim. Biophys. Acta 63, 194-200.
201. Upadhyay, J.M. (1968) - "Growth and bacteriolytic activity of a soil amoeba Hartmannella glebae". - J. Bacteriol. 95, 771-774.
202. Vickerman, K. (1962) - "Patterns of cellular organization in Limax amoebae. An electron microscopic study". - Exp. Cell Res. 26, 497-519.
203. Vinograd, J. e Hearst, J.E. (1962) - "Equilibrium sedimentation of macromolecules and viruses in a density gradient". - Fortschr. Chem. Org. Natstoffe 20, 372-420.
204. Volkonsky, M. (1931) - "Hartmannella castellani Douglas et classification des Hartmannelles". - Arch. Zool. Exp. Gén. 72, 317-339.
205. Walker, P.M.B. (1971) - "Repetitive DNA in higher organisms". - Progr. Biophys. Mol. Biol. 23, 145-190.
206. Wang, S.S. e Feldman, H.A. (1961) - "Occurrence of Acanthamoeba in tissue cultures inoculated with human pharyngeal swabs". - Antimicrob. Agents Chemother. 1, 50-53.

207. Waring, M. e Britten, R.J. (1966) - "Nucleotide sequence repetition. A rapidly reassociating fraction of mouse DNA". - Science 154, 791-793.
208. Weisman, R.A. e Moore, M.O. (1969) - "Bead up-take as a tool for studying differentiation in Acanthamoeba". - Exp. Cell Res. 54, 17-22.
209. Weisman, R.A.; Spiegel, R.S. e McCauley, J. G. (1970) - "Differentiation in Acanthamoeba: glycogen levels and glycogen shynthetase activity during encystment". - Biochim. Biophys. Acta 201, 45-53.
210. Wells, R. e Birnstiel, M.L. (1969) - "Kinetic complexity of chloroplastal DNA and mitochondrial DNA from higher plants". - Biochem. J. 112, 777-786.
211. Wells, R. e Sager, R. (1971) - "Denaturation and the renaturation kinetics of chloroplast DNA from Chlamydomonas reinhardi". - J. Mol. Biol. 58, 611-622.
212. Wetmur, J.G. (1967) - "Studies on the kinetics of renaturation of DNA". - Tese de Ph.D. , Calif. Inst. of Technology, California.
213. Wetmur, J.G. e Davidson, N. (1968) - "Kinetics of renaturation of DNA". - J. Mol. Biol. 31, 349-370.
214. Wimber, D.E. e Steffensen, D.M. (1970) - "Localization of 5S RNA genes on Drosophila chromosomes by RNA-DNA hybridization". - Science 170, 639-641.
215. Yasmineh, W.G. e Yunis, J.J. (1970) - "Localiza-tion of mouse satellite DNA in constitutive heterochromatin". - Exp. Cell Res. 59, 69-75.