ROBERT IVAN SCHUMACHER

EFEITO DE LESÕES EM DNA PRODUZIDAS POR LUZ
ULTRAVIOLETA NO PROCESSO DE REPLICAÇÃO DO
GENOMA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica, Instituto
de Química, Universidade de São Paulo.

SÃO PAULO
1981

A meus pais,
e aos pais de meus pais,
in memoriam.

AGRADECIMENTOS

Seguramente, são poucas as oportunidades em que podemos externar nossos sentimentos em letra de forma, neste ramo de atividades. Creio portanto que estas chances devem ser aproveitadas ávidamente. De minha parte houve esta intenção, e qualquer omissão que porventura tenha ocorrido, peço que se atribua à própria avidez de redação.

Ao Dr. Rogério Meneghini, pela sólida orientação teórica e prática, pela amizade sincera e pelo ininterrupto estímulo ao longo desta etapa de minha vida acadêmica. Seu convívio profissional e pessoal foi para mim extremamente fecundo com respeito à familiarização com a filosófia da investigação científica.

À verdadeira legião de colegas de laboratório, Carlos F.M. Menck, Maria E. Hoffmann, Hugo P. Monteiro, Armando M. Ventura, José M. Ortega, Alberto E.C. de Mello Filho, José C. Pompeu, Nelson Caldini Jr., Gilka Terni, Eustratios Filippidis (ao qual devo a elaboração de alguns dos desenhos desta tese). Alguns contribuíram para a parte experimental da tese e todos propiciaram um ambiente estimulante e rico em discussões e sugestões.

Menção especial merece a Dra. Marila Cordeiro-Stone, com a qual tive a satisfação de trabalhar em estreita colaboração durante parte considerável do trabalho experimental, etapa esta que me marcou de modo muito favorável.

À Srta. Maria do Céu Q. de Sá Moraes, por manter estes últimos anos o laboratório em condições exemplares de higiene e funcionalidade.

À Yvone de Abreu, pelo excelente serviço datilográfico do material desta tese.

Aos demais componentes de grupos de investigação do Instituto de Química da USP, que invariavelmente prestaram auxílio material e de aparelhamentos, por vezes essenciais para o prosseguimento da parte experimental.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo imprescindível apoio financeiro nos últimos seis anos, seja na forma de bolsas de estudo, como em auxílios à pesquisa.

A todos, meu muito obrigado.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	1
1. Agentes químicos e físicos afetam a integridade estrutural de DNA	1
2. Processos de reparo de DNA lesado	4
3. Consequências biológicas de lesões não reparadas em DNA	13
4. Indução de mecanismos de tolerância a lesões em DNA	20
II. MÉTODOS E MATERIAIS	27
1. Células	27
1.1 Linhagens	27
1.2 Cultivo	28
1.3 Marcação	28
1.4 Sincronização de ciclo celular	29
1.5 Incubação de células na presença de cafeína	29
2. Irradiação com luz UV a 254 nm	30
2.1 Condições de irradiação	30
2.2 Dosimetria	30
3. Determinação da taxa de síntese de DNA	31
4. Isolamento de DNA	32
4.1 Extração e purificação	32
4.2 Obtenção de DNA de alto peso molecular	33
5. Ultracentrifugação de DNA em gradientes lineares de concentração de sacarose	34
5.1 Obtenção de gradientes lineares	34
5.2 Condições de ultracentrifugação	35
5.3 Coleta de gradientes e obtenção de perfis de sedimentação de DNA	36

	Pág.
6. Estimativa de peso molecular de DNA	37
6.1 Princípios do método	37
6.2 Cálculo do peso molecular médio de DNA	39
7. Ultracentrifugação de DNA em gradientes iso- pícnicos de CsCl	40
7.1 Preparação dos gradientes e condições de centrifugação	40
7.2 Determinação dos perfis de bandeamento de DNA em gradientes de densidade de CsCl	41
7.3 Recuperação de DNA de alto peso molecu- lar após bandeamento em gradientes de densidade de CsCl	42
8. Caracterização de lacunas em DNA	43
8.1 Ensaio com S_1 -endonuclease de <u>Aspergillus</u> <u>oryzae</u>	43
8.2 Determinação da frequência de clivagens produzidas em DNA simples-fita por con- centrações crescentes de S_1 -endonuclea- se	44
8.3 Frequência de clivagens produzidas por S_1 -endonuclease em crescentes concen- trações de DNA simples-fita	45
9. Comparação entre o peso molecular de DNA sin- tetizado após diferentes tratamentos com UV e a distância interdímeros média no DNA-mol- de	45
10. Materiais	47
III. RESULTADOS	49
1. Taxa de síntese de DNA em células irradiadas com UV	49

	Pág.
2. Peso molecular inicial e taxa de elongação de DNA recém-sintetizado em células irradiadas com UV	51
3. Sítios sensíveis à S_1 -endonuclease em DNA sintetizado após UV	54
3.1 Perfil de sedimentação de DNA após tratamento enzimático	54
3.2 Perfil de sedimentação de DNA após crescentes doses de UV. Correlação com o peso molecular de DNA recém-sintetizado	58
3.3 Efeito das condições de pulso com precursor marcado	60
3.4 Correlação entre o peso molecular de L-DNA e a dose de UV fornecida	63
3.5 Destino de L-DNA	66
4. Perfil de bandejamento de DNA em gradientes isopícnicos de CsCl, antes ou após tratamento com S_1 -endonuclease	68
5. Sítios sensíveis à S_1 -endonuclease em DNA sintetizado após UV, em diferentes condições experimentais	74
5.1 Culturas com ciclo celular sincronizado	74
5.2 Efeito da presença de cafeína no meio de cultura. Correlação com o peso molecular de DNA sintetizado após UV	76
5.3 Diferentes linhagens celulares	79
6. Sítios sensíveis à S_1 -endonuclease em DNA sintetizado após UV, próximo ou afastado da forquilha de replicação	81
7. Sensibilidade de DNA simples-fita ao tratamento com S_1 -endonuclease	83
7.1 Efeito de concentrações crescentes de S_1 -endonuclease	83

	Pág.
7.2 Efeito de concentrações crescentes de DNA simples-fita	85
8. Sensibilidade de DNA replicado após UV a crescentes concentrações de S_1 -endonuclease	87
9. Sítios sensíveis à S_1 -endonuclease em DNA sintetizado após diferentes condições de irradiação UV	89
9.1 DNA sintetizado longo tempo após UV ou após doses fracionadas de UV	89
9.2 Comparação entre o peso molecular de DNA recém-sintetizado e a frequência de dímeros no DNA-molde	92
IV. DISCUSSÃO	94
1. Efeito de irradiação UV sobre a taxa de síntese e de elongação de DNA	94
2. Presença de lacunas em DNA sintetizado após irradiação UV	97
3. Um modelo de replicação de DNA a partir de molde lesado	101
4. Frequência de lacunas em DNA replicado após UV	107
5. Extensão das lacunas em DNA replicado após UV	108
6. Indução de RPR em células previamente irradiadas com UV	112
7. Conclusões e perspectivas	116
V. RESUMO	121
VI. SUMMARY	124
VII. APÊNDICE	127
VIII. BIBLIOGRAFIA	128
IX. ABREVIACÕES	144

I. INTRODUÇÃO

1. AGENTES QUÍMICOS E FÍSICOS AFETAM A INTEGRIDADE ESTRUTURAL DO DNA

O conteúdo de DNA em uma célula viva é constante para uma dada espécie, variando em média de 10^6 pares de bases em procariotos, até 10^{11} pares de bases, no caso de eucariotos. Estas bases estão ordenadas de uma forma precisa ao longo das cadeias de DNA, formando assim as diferentes informações genéticas. Dessa forma, o DNA constitui-se fundamentalmente no repositório de informação para o desencadeamento e regulação da imensa maioria dos eventos metabólicos que ocorrem in vivo. Por outro lado, não obstante o fato da replicação semiconservativa de DNA envolver necessariamente complementaridade de bases, permitindo assim a perpetuação da informação contida no genoma (WATSON & CRICK, 1953), sabe-se hoje que DNA é continuamente sujeito a alterações deletérias in vivo, de diversas naturezas.

Neste contexto, tem sido estudados diferentes agentes químicos e físicos, no que se refere à capacidade de promover a formação de descontinuidades estruturais em DNA. Assim, é conhecida no presente uma ampla variedade de substâncias químicas capazes de reagir com DNA, bem como é sabido que praticamente todos os grupos reativos presentes na cadeia de DNA estão potencialmente sujeitos à alquilação. No caso das bases, são passíveis de reações de adição

os nitrogênios tomando parte em anéis, os aminogrupos de citosina, guanina e adenina (DIPPLE e col., 1971), todos os oxigênios (SINGER, 1976) e o carbono-8 de adenina e guanina (MILLER & MILLER, 1969). Além disso, mesmo a ponte de fosfato entre dois nucleosídeos adjacentes pode sofrer modificações químicas, ocasionando a formação de fosfotriesteres (BANNON & VERLY, 1972; LAWLEY, 1973). Porém, a capacidade de interação com DNA não está restrita a agentes químicos exógenos, já que pelo menos um constituinte fisiológico normal de células, no caso H_2O_2 , está envolvido na ocorrência de quebras na cadeia de DNA, após irradiação com luz visível (HOFFMANN & MENEHINI, 1979).

Por outro lado, radiação ionizante (raios X e γ) produz um espectro bastante heterogêneo de lesões em DNA, onde se incluem simples e duplas quebras de cadeia, perda de bases (nesse caso acarretando a formação de sítios apurínicos e apirimidínicos); saturação da dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 em pirimidinas, e mesmo lesões na porção de deoxiribose. Também o calor afeta a estabilidade estrutural de DNA. Um exemplo é a taxa de formação espontânea de sítios apurínicos em DNA, a qual é dependente de temperatura. Não se trata de qualquer maneira de um fenômeno restrito a condições experimentais drásticas, uma vez que em condições fisiológicas normais ocorre a significativa taxa de 10.000 depurinações por genoma, por dia, em células humanas (LINDAHL & NYBERG, 1972).

Todas as lesões até aqui descritas se traduzem numa degeneração variável da capacidade de cópia por parte da maquinaria de replicação de DNA. Isto porque

afetam em maior ou menor grau o pareamento correto de bases, não permitindo consequentemente a manutenção de fidelidade de duplicação do DNA-molde.

A lesão em DNA melhor estudada até o momento é seguramente o dímero de pirimidina, formado quando DNA é irradiado com luz UV em uma determinada faixa de comprimentos de onda (220-310 nm), e primeiramente descrito por BEUKERS & BERENDS (1960). Nesse caso, ocorre a formação de um anel ciclobutano entre duas pirimidinas consecutivas na mesma cadeia de DNA, com um rendimento quântico máximo quando as pirimidinas correspondem a ~~t~~iminas. Esta dimerização de pirimidinas acarreta uma distorção local da dupla hélice de DNA, além de uma perda da capacidade de formar pontes de hidrogênio com as purinas opostas à lesão.

A vantagem de se adotar esta lesão como modelo, à parte ser a mais estudada, prende-se ao fato de que luz UV, nas condições usuais de ensaio, propicia apenas a formação de dímeros, não se detectando a introdução de lesões em DNA de outra natureza, pelo menos dentro dos limites de sensibilidade dos métodos de análise disponíveis no momento. Além disso, é possível quantificar com relativa facilidade o conteúdo de dímeros presentes no DNA, e mesmo reproduzir-se condições experimentais de forma bastante precisa. Vale todavia ressaltar que a luz solar ambiental também propicia a formação de dímeros em DNA.

Estes fatores foram levados em consideração, tendo-se optado pelo dímero de pirimidina como lesão-modelo em DNA para a elaboração da parte experimental desta tese.

Por outro lado, deve ser salientado que resultados muito recentes (LIPPKE e col., 1981) sugerem a ocorrência de outro tipo de lesão, envolvendo citidina e uma pirimidina adjacente em 5' na mesma fita de DNA, quando células são irradiadas com doses moderadas ou altas de UV a 254 nm. A relevância deste tipo de lesão, no que se refere a consequências biológicas, permanece contudo uma questão em aberto.

2. PROCESSOS DE REPARO DE DNA LESADO

No que se refere à probabilidade de sobrevivência celular após determinada injúria, a inativação de algumas enzimas, RNA, ribossomos e outras organelas tem relativamente pouca importância, uma vez que existe a possibilidade de reposição por parte da célula. Este conceito não deve todavia ser generalizado, uma vez que existem evidências de que lesões na membrana citoplasmática podem levar a lise celular (COOK, 1965).

De qualquer modo, a manutenção da integridade do genoma é fundamental para assegurar a viabilidade e capacidade de reprodução das células. Por um lado, o genoma se apresenta frequentemente em cópias únicas na célula, e por outro, a complexidade que pode assumir, envolvendo mesmo macroestruturas com outras moléculas como é o caso de cromossomos, implica num tempo de ressíntese demasiadamente longo e oneroso sob o ponto de vista metabólico, tornando inviável a sua reposição pura e simples.

Não é portanto surpreendente que os sistemas conhecidos de reparo biológico ao nível molecular envolvam o componente informacional da célula, representado quase que exclusivamente por DNA. Este fato não descarta porém a possibilidade de ocorrerem sistemas de reparo para outros componentes biológicos, tendo sido já descritos sistemas de reparo atuando sobre RNA de vírus de mosaico de tabaco (TMV), neste caso correspondendo à molécula informacional (GORDON, 1975).

Assim, foram caracterizados diferentes mecanismos de reparo de DNA, os quais removem ou contornam as lesões presentes no genoma. Sob o ponto de vista mecânico, estes sistemas podem ser divididos em três tipos:

A. Reparo de fotoreativação. Biológica e bioquimicamente falando, trata-se da reativação por luz visível de uma célula inativada por luz UV. Nesse caso as principais lesões em DNA produzidas por luz UV a 254 nm, os dímeros de pirimidina, são de grande importância na inativação celular (SETLOW & SETLOW, 1962), e são especificamente revertidos a monômeros na presença de uma enzima de fotoreativação (também denominada fotoliase) e luz visível no espectro de 300-350 nm. Sistemas de fotoreativação são encontrados em todas as células e organismos ao longo da evolução, com a possível exceção de mamíferos placentários (COOK, 1972), não tendo sido caracterizada porém até o momento nenhuma outra lesão em DNA passível de fotoreativação, como no caso de dímeros de pirimidina.

B. Reparo-excisão. Este é incontestavelmente o processo de reparo de DNA mais estudado, tanto em procariotos como em eucariotos. O primeiro modelo proposto para este tipo de reparo (SETLOW & CARRIER, 1964; BOYCE & HOWARD-FLANDERS, 1964) continua essencialmente válido e consiste de um processo de quatro etapas. Inicialmente uma endonuclease produz uma incisão na ponte de fosfodiester, numa posição adjacente às bases danificadas, seguindo-se a remoção do trecho de DNA contendo a lesão, por meio de uma exonuclease. A lacuna resultante é então novamente preenchida por DNA-polimerase, utilizando como molde a fita oposta, neste caso intacta. Finalmente, o trecho de DNA resintetizado é ressociado ao DNA pré-existente através de DNA-ligase.

Não obstante a validade dos princípios gerais do modelo descrito, alguns detalhes mecanísticos revelaram-se com o passar do tempo, bem mais complicados. Isto é verdade mesmo no caso de procariotos, de onde se obteve a imensa maioria dos dados experimentais existentes, relativos a este tipo de reparo.

Um exemplo disso é a descoberta de que podem ocorrer pelo menos dois tipos de reparo-excisão. O primeiro, denominado excisão de nucleotídeos, é análogo ao modelo clássico anteriormente descrito, sendo responsável pela remoção, entre outras lesões, de dímeros de pirimidina em E. coli. Um segundo processo foi descrito, neste caso não envolvendo porém a ruptura inicial da ponte de fosfato por uma endonuclease, mas sim ruptura da ligação glicosídica entre a base alterada e a deoxiribose correspondente, por uma DNA

N-glicosilase (LINDAHL, 1976), ruptura esta que também pode ocorrer espontaneamente. O sítio apurínico ou apirimidínico (AP) assim gerado é reconhecido por uma AP endonuclease, a qual cliva por sua vez a ponte de fosfodiéster, seguindo-se então etapas subsequentes análogas ao processo anterior, envolvendo DNA-exonuclease, polimerase e ligase.

De qualquer modo este mecanismo, denominado excisão de bases, parece ser o responsável pela remoção de uracil ou hipoxantina, incorporada erroneamente em DNA, e pelo reparo de lesões promovidas por raios γ e determinados agentes alquilantes, além de dímeros de pirimidina em vírus T_4 e M. luteus. Outra diferença significativa é a extensão de DNA ressintetizado a partir dos dois processos. Assim, em células humanas, excisão de nucleotídeos envolve trechos de DNA em torno de 100 nucleotídeos ("large patch repair") enquanto que excisão de bases envolve apenas 3 a 4 nucleotídeos ("small patch repair") (REGAN & SETLOW, 1974).

De qualquer forma, é preciso salientar que os detalhes mecanísticos acerca de reparo-excisão são sobejamente mais conhecidos no caso de bactérias, uma vez que se dispõe de uma genética muito mais avançada, quando comparada com a de eucariotos. Assim, é possível isolar mutantes para as diferentes etapas do processo, e comparar-se respostas biológicas ao nível bioquímico. Por outro lado, enfoques experimentais utilizando leveduras como sistema biológico tem-se revelado promissores, uma vez que nesse caso trata-se de um sistema eucarioto, o qual permite todavia um isolamento relativamente fácil de mutantes de reparo.

Apesar das primeiras evidências da ocorrência de reparo excisão em células de mamíferos (RASMUSSEN & PAINTER, 1964) serem contemporâneas aos achados em sistemas bacterianos, os detalhes mecanísticos do processo de reparo são muito mais conhecidos no último caso. Este fato é previsível, já que existe uma grande dificuldade experimental em se isolar mutantes a partir de células de mamíferos em cultura. De qualquer modo, as etapas básicas de reparo-excisão em células de mamíferos parecem ser análogas às aquelas observadas em bactérias, podendo haver todavia diferenças consideráveis em alguns pontos particulares (HANAWALT & col., 1979).

Por outro lado, a descoberta de sistemas de reparo deficientes em células humanas derivadas de portadores de determinadas desordens genéticas foi de grande valia para se obter um salto qualitativo na compreensão de diferentes fenômenos relacionados com reparo. Porém, apesar da descrição de um número cada vez maior de desordens genéticas desse tipo (ROBBINS, 1979), o quadro geral permanece ainda bastante controvertido.

O exemplo clássico de desordem genética envolvendo deficiência de reparo de DNA é o de xeroderma pigmentosum (XP). Trata-se de uma doença genética autossômica recessiva rara, que confere a seus portadores uma extrema sensibilidade da pele à luz solar, com frequente ocorrência de câncer da pele. Foi verificado nesse caso que as células derivadas desses pacientes não apresentaram reparo de dímeros de pirimidina, introduzidos em DNA após irradiação com UV (CLEAVER, 1969). A virtual ausência de reparo-excisão nes

tas células tem-se constituído numa ferramenta extremamente útil para a avaliação dos efeitos biológicos e bioquímicos acarretados pela introdução de lesões em DNA, como será visto mais adiante.

Vale salientar, que grande parte do trabalho experimental desta tese foi efetuada com uma linhagem XP (XP12RO).

C. Reparo pós-replicação. O fato de uma célula ser proeficiente em reparo-excisão não é per si suficiente para assegurar a ausência de consequências biológicas decorrentes da introdução de lesões em DNA. Assim, uma frequência crescente de lesões no genoma implica num aumento da probabilidade da maquinaria de replicação encontrar uma lesão no DNA-molde antes desta ter sido reparada.

Quando isto de fato ocorre, a replicação de DNA não pode continuar além desse ponto, uma vez que a lesão não é codificadora e impede o pareamento correto de bases, do tipo Watson-Crick. Apesar disso, é surpreendente o número de lesões não reparadas que uma célula pode tolerar, sem perder a viabilidade e capacidade reprodutiva.

Neste contexto, é sabido que células de roedores contendo 10^5 a 10^6 dímeros de pirimidina no genoma são capazes de proliferar, a despeito de possuírem uma baixa taxa de reparo-excisão. Também células XP, neste caso totalmente depletadas de reparo-excisão, apresentam 37% de sobrevivência após a introdução de cerca de 10^4 dímeros em seu genoma.

Estes dados indicam que as células devem possuir uma estratégia alternativa adequada para contornar as lesões encontradas durante a replicação de DNA, propiciando assim uma efetiva duplicação do material genético, independente da permanência de lesões no DNA.

No caso de bactérias, já foi estabelecido que quando a maquinaria de replicação encontra um dímero na fita-molde de DNA ocorre um bloqueio temporário da síntese neste ponto, a qual é todavia reassumida num ponto além da lesão, permanecendo uma lacuna no DNA recém-sintetizado (RUPP & HOWARD-FLANDERS, 1968; IYER & RUPP, 1971). Um fenômeno análogo, envolvendo a formação de lacunas em DNA recém-sintetizado, numa região oposta à lesão, foi proposto também para o caso de mamíferos (LEHMANN, 1972). A interpretação de lacunas tem permanecido porém controversa, neste último caso. Isto é devido ao fato da própria replicação normal de DNA em eucariotos ser um processo extremamente complexo e ainda pouco conhecido, envolvendo a atividade simultânea de múltiplos replicons ao longo do genoma (HUBERMAN & RIGGS, 1968). No entanto, uma abordagem mais ampla acerca deste tópico será feita no decorrer da "Discussão" desta tese.

De qualquer forma, lesões no DNA-molde representam bloqueios para a síntese de DNA tanto in vitro (MOORE & STRAUSS, 1978; MOORE e col., 1981) como in vivo (DONIGER, 1978; CORDEIRO-STONE e col., 1979). Assim, a presença de lesões no genoma acarreta a formação de um DNA recém-sintetizado de menor peso molecular (LEHMANN, 1972; CORDEIRO-STONE, e col., 1979). Esta observação é consistente com a hipótese

de ocorrerem descontinuidades físicas no DNA recém-sintetizado, vale dizer, lacunas opostas a lesões.

Todavia, este DNA inicialmente menor apresenta uma efetiva elongação, e no decorrer do tempo após a injúria, termina por alcançar um peso molecular equivalente ao do DNA parental. Esta capacidade de crescimento de DNA recém-sintetizado, não obstante a permanência das lesões no DNA-molde, é definida operacionalmente como reparo pós-replicação (RPR). Apesar de se tratar aqui de uma nomenclatura consagrada, não se trata propriamente de um processo de reparo, uma vez que as lesões não são eliminadas do genoma, mas sim de um mecanismo possivelmente vinculado com a própria replicação de DNA, ao menos no caso de eucariotos.

Em bactérias, RPR consiste essencialmente de um mecanismo de intercâmbio recombinacional de DNA simples-fita correspondendo à porção de DNA oposta à lacuna e que contém a lesão, com outro trecho isopolar do DNA parental (RUPP e col., 1971; LEY, 1973). Este mecanismo previne a cópia direta da lesão, e a lacuna remanescente pode então ser preenchida por simples ressíntese, de forma análoga à que ocorre em reparo-excisão.

Já no caso de RPR em mamíferos, sistemas de recombinação parecem ser muito pouco atuantes (LEHMANN & KIRK-BELL, 1978; MENECHINI & MENCK, 1978), tendo sido inicialmente proposto um mecanismo de síntese de novo de DNA para efetuar o preenchimento das lacunas (LEHMANN, 1972). Porém, este ponto ainda não está totalmente elucidado, uma vez que a própria ocorrência de lacunas, em DNA de eucariotos, foi posteriormente questionada, havendo uma explicação alternati

va para o baixo peso molecular de DNA sintetizado a partir de DNA-molde lesado (EDENBERG, 1976).

Mais recentemente, foi possível demonstrar a presença inequívoca de lacunas em DNA de células humanas irradiado com UV e replicado, através de uma metodologia envolvendo digestão de DNA recém-sintetizado após a injúria com endonucleases específicas para DNA simples-fita (MENEGHINI, 1976; CORDEIRO-STONE e col., 1979). A mesma metodologia permitiu posteriormente a determinação da extensão física das lacunas, encontrando-se duas populações distintas (MENEGHINI e col., 1981). Porém, apenas uma das duas populações de lacunas encontradas apresentou uma extensão análoga à uma medida efetuada anteriormente, utilizando uma metodologia diversa (LEHMANN, 1972). Por outro lado, não foi possível até o momento obter-se evidências diretas da presença de lesões diretamente opostas às lacunas, através de enfoques experimentais utilizando tratamentos enzimáticos específicos (MENEGHINI & HANAWALT, 1976; CLARKSON & HEWITT, 1976). Neste caso, tem-se entretanto boas evidências indiretas de que isto ocorre, pelo menos no caso de bactérias (SMITH & MEUN, 1970; BRIDGES & SEDGWICK, 1974).

Independente dos detalhes topológicos relativos às posições da lesão e da lacuna no DNA replicado, é fato que a lesão permanece no DNA-molde durante o preenchimento desta descontinuidade. Como a lesão no entanto não tem propriedades codificadoras, uma certa extensão de bases não pareadas poderia ser introduzida neste ponto. Esta hipótese é consistente com o achado de que pelo menos uma parte de RPR em bactérias é bastante sujeita a erros, dando origem a

mutações (WITKIN, 1969). Em eucariotos, uma abordagem genética preliminar sugeriu também essa possibilidade (MAHER e col., 1976a).

Estes fatores tornam o estudo de RPR de fundamental importância para a compreensão da origem de mutações e possivelmente de câncer.

3. CONSEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS DE LESÕES NÃO REPARADAS EM DNA

A existência de uma relação causal entre determinados agentes químicos e físicos, artificiais ou ambientais, e a ocorrência de alterações biológicas e bioquímicas em células ou organismos é um fato há muito conhecido. Todavia, o mecanismo íntimo de desencadeamento de respostas biológicas a partir da exposição a esses agentes permanece uma questão em aberto. De qualquer maneira, sabe-se agora que estes agentes são capazes de lesar o genoma, e crescem as evidências de que este é o evento que desencadeia as consequências biológicas, acarretando morte celular, mutações e mesmo transformação maligna.

A forma clássica de se analisar os efeitos biológicos de uma lesão presente no genoma é sem dúvida a comparação das consequências de um determinado insulto em células selvagens, e outros mutantes derivados destas, nesse caso deficientes em reparo das lesões em questão. Este enfoque experimental, largamente utilizado em sistemas procariotos, devido à relativa facilidade de isolamento de mutantes específicos, é no entanto de limitada aplicação em sistemas superiores.

De qualquer modo, este tipo de abordagem tem sido utilizado com sucesso em células humanas. Assim, foi possível comparar-se os efeitos de luz UV e outros agentes que lesam DNA, em células normais e células derivadas principalmente de portadores de XP, muito embora outras desordens genéticas envolvendo deficiências de reparo de DNA também venham sendo objeto de estudo.

Utilizando como parâmetro biológico o índice de letalidade celular frente a frequências crescentes de lesões inicialmente introduzidas no genoma, foi possível verificar uma sensibilidade muito maior em células XP, quando comparadas com células normais. Nesse caso, foi observado que no caso de células proficientes em reparo-excisão era necessária a introdução de um número muito mais elevado de lesões no DNA para se observar uma letalidade análoga à célula XP. Este resultado sugere fortemente que as lesões não reparadas remanescentes no genoma são as responsáveis por morte celular.

Resultados análogos foram observados também no caso de se avaliar a frequência de mutações induzidas por injúria ao genoma. Assim, a frequência de mutações per dose encontrada em células XP é significativamente mais elevada que em células normais (MAHER e col., 1976a; MYHR e col., 1979). No entanto, deve ser salientado que cargas equitóxicas de lesões traduzem-se essencialmente numa mesma frequência de mutações para ambos os casos (MAHER e col., 1976b; MYHR e col., 1979). Esta última observação é de extrema importância, uma vez que permite inferir a não mutagenicidade do processo de reparo-excisão. Isto porque

células normais neste caso receberam uma carga de lesão inicial muito maior, ocorrendo portanto uma taxa proporcionalmente maior de reparo-excisão, de forma a se obter um conteúdo de lesões, análogo ao de XP, quando do desencadeamento de respostas biológicas equivalentes.

Uma evidência mais direta acêrca do papel de lesões em DNA não reparadas, quanto a efeitos biológicos, é obtida quando as células são mantidas num estágio quiescente ou não-proliferativo, por diferentes tempos após a injúria. Nestas condições, não ocorre replicação ativa de DNA, sendo porém mantidas outras funções celulares, inclusive capacidade de reparo-excisão.

Assim, verificou-se que células humanas normais contendo um genoma lesado, e mantidas por tempo crescentes neste estado não proliferativo exibiam, após o reestímulo para crescimento normal, uma gradual queda da taxa de letalidade (CHAN & LITTLE, 1979; MAHER e col.1979; SIMON, 1979) e da frequência de mutações (MAHER e col.1979). Estes fenômenos não ocorreram todavia para o caso de células XP, onde mesmo tempos muito longos de quiescência celular não produziram qualquer alteração significativa destes dois parâmetros biológicos. Resultados análogos foram obtidos por NAKANO e col. (1979), em células V-79 de hamster chinês, onde a taxa de letalidade e a indução de mutações foram também deprimidas quando as células injuriadas eram impedidas de proliferar por longos períodos após a introdução das lesões.

Outro parâmetro biológico utilizado para a avaliação dos efeitos de lesões não reparadas no geno-

ma é a indução de transformação maligna. Porém, este critério teve um alcance restrito por um longo período, já que células humanas, das quais se conhece a maioria dos mutantes de reparo, são dificilmente transformadas por agentes químicos e físicos. Apenas muito recentemente foram descritas transformações de células humanas por carcinogênicos químicos (KAKUNAGA, 1978; MILO & DIPAOLO, 1978), por raios-X (BOREK, 1980) ou por irradiação com UV (SUTHERLAND e col., 1980).

Em células mais susceptíveis de transformação, como no caso de células 3T3 de camundongo, foi visto que a manutenção, após injúria, num estágio pré-replicativo, acarretava um nítido decréscimo no índice de transformação oncogênica (KAKUNAGA, 1974). Mais tarde, foi possível obter uma correlação direta entre este declínio da frequência de transformação e a taxa de remoção enzimática das lesões presentes no DNA das células (IKENAGA & KAKUNAGA, 1977). Infelizmente, a ausência de mutantes de reparo para esta linhagem celular impede todavia uma conclusão definitiva acerca do fenômeno.

Neste ponto, a hipótese mais consistente que emerge desse quadro de resultados antes descrito, é a de que os efeitos biológicos de lesões não reparadas no DNA são desencadeados durante a replicação do genoma lesado. Assim, a manutenção das células num estágio pré-replicativo por diferentes períodos facultaria a remoção de uma fração crescente das lesões presentes por reparo-excisão, diminuindo portanto as consequências deletérias na progenia. Já em células XP, a virtual ausência desses mecanismos de remoção de lesões se traduziria na total ineficácia do período

de quiescência celular em promover um retorno à normalidade. Além disso, estes experimentos sugerem fortemente a não introdução de erros na informação genética pelo processo de reparo-excisão das lesões, isto é, este mecanismo de reparo-excisão seria livre de erros ou não-mutagênico.

Por outro lado, uma forma direta e elegante de avaliar o papel de lesões não reparadas no desencadeamento de determinados efeitos biológicos é sem dúvida fotoreativação de dímeros de pirimidina, uma lesão de DNA e-xhaustivamente descrita como sendo potencialmente letal, mutagênica e mesmo carcinogênica. Desse modo, resultados recentes com fibroblastos de Xenopus laevis (NATARAJAN e col., 1980) e células ICR 2A de sapo (ROSENSTEIN & SETLOW, 1980) mostraram que a gradual eliminação de dímeros em DNA, introduzidos por luz UV, por posterior fotoreativação, acarretava uma queda da taxa de letalidade celular. Estes dados supor tam a hipótese de que os dímeros são as lesões críticas res ponsáveis pela mortalidade celular, uma vez que fotoreativação é específica para estas lesões. Além disso, deve ser salientado que uma conclusão analoga pôde ser obtida quando se mediu a taxa de mutações decorrentes da presença de dímeros no genoma, antes e após fotoreativação (NATARAJAN e col., 1980).

No que se refere à carcinogênese, pelo menos uma evidência direta, correlacionando presença de dímeros no genoma e câncer pôde ser obtida. Assim, células do peixe ginogenético (de reprodução não sexual) Poecelia formosa foram irradiadas com luz UV e em seguida injetadas em recipientes isogênicos, neste caso não havendo barreiras

imunológicas ao transplante. Observou-se assim a formação de tumores em diferentes órgãos dos animais receptores. Porém, a fotoreativação prévia das células irradiadas e transplantadas resultou numa dramática diminuição do número de tumores detectado (SETLOW & HART, 1975). Isto indica que os dímeros desempenham um papel essencial na tumorigênese, devendo-se lembrar todavia que a presença de lesões não é suficiente per si para a produção do efeito final, devendo ocorrer outros eventos pós-mutacionais (BARRET & Ts'O, 1978; KINSELLA & RADMAN, 1980).

Outros parâmetros biológicos afetados pela presença de lesões no genoma celular correspondem à indução de trocas de cromátides irmãs (SCE) e a assim chamada reativação viral pelo hospedeiro. SCE consiste na troca de partes homólogas de cromátides filhas durante a mitose e foi primeiramente descrita por TAYLOR (1959). Todavia a significância desse fenômeno permanece discutível, em termos de consequências deletérias para a progenia, apesar de existirem evidências de que vários agentes mutagênicos e carcinogênicos incrementam a frequência de SCE (PERRY & EVANS, 1975). Além disso, sabe-se que as células insultadas devem passar por uma fase de replicação de DNA para que o efeito se expresse (KATO, 1973a,b; WOLFF e col., 1974).

Reativação viral pelo hospedeiro consiste na observação de que vírus contendo um genoma lesado podem ser reativados após infecção da célula hospedeira. Neste caso, a maquinaria de reparo de DNA da célula hospedeira "coopera" com o invasor, propiciando a eliminação de lesões e acarretando um ciclo lítico por parte do vírus. Is

to ocorre por exemplo quando células humanas são infectadas com vírus previamente irradiados com UV. Porém, quando células XP são usadas como hospedeiras, não ocorre lise celular apreciável (AARONSON & LYTTLE, 1970; DAY, 1974), confirmando as evidências de que estas células são deficientes em reparo-excisão de dímeros de pirimidina.

Um fenômeno correlato, apesar de distinto, é a chamada reativação viral amplificada, primeiramente observada em bactérias, por WEIGLE (1953), e por isso também denominada reativação-Weigle. Assim, quando vírus previamente expostos a luz UV infectavam bactérias hospedeiras também irradiadas, ocorria uma sobrevivência e uma taxa de mutações virais muito mais elevadas que no caso de hospedeiras não irradiadas. Por outro lado, a fotoreativação prévia das células hospedeiras eliminava este efeito (WEIGLE, 1953).

De qualquer modo, efeitos análogos foram observados em células de mamíferos, utilizando-se como substratos de reativação diferentes vírus de DNA, tais como Herpes (DAS GUPTA & SUMMERS, 1978; LYTTLE e col., 1972; LYTTLE e col., 1976; LYTTLE e GODDARD, 1979), SV40 (BOCKSTAHLER & LYTTLE, 1977; SARASIN & HANAWALT, 1978) e Adenovirus (BOCKSTAHLER & LYTTLE, 1977), muito embora Vaccinia e Poliovirus tenham fornecido resultados negativos (BOCKSTAHLER & LYTTLE, 1977). A proficiência das células em reparo-excisão das lesões virais parece contudo ser pouco relevante para a ocorrência deste fenômeno, uma vez que células XP, neste caso, tem o mesmo comportamento que células normais (LYTTLE e col., 1976).

As implicações ao nível bioquímico, deste e outros fenômenos serão todavia analisadas de modo mais detalhado no próximo item desta "Introdução".

4. INDUÇÃO DE MECANISMOS DE TOLERÂNCIA A LESÕES EM DNA

Como ocorre com a maioria dos eventos relacionados com esta área de investigação, os mecanismos de replicação de DNA a partir de um molde lesado são muito mais conhecidos em sistemas bacterianos. Assim, já foi descrito anteriormente um mecanismo de recombinação de DNA que evita a cópia direta da lesão (GANESAN, 1974; GANESAN & SEAWELL, 1975). (ver o item 2 desta "Introdução"). Contudo, existem várias evidências da possibilidade de uma replicação direta da lesão, não obstante a ausência de propriedades codificadoras, e que poderíamos chamar de síntese translesão. A explicação mais aceita no momento para o bloqueio de síntese quando uma lesão é encontrada no DNA-molde, baseia-se na constatação de uma atividade exonucleolítica 3'-5', também chamada de atividade editorial, presente em DNA polimerase I e III de E. coli.

Assim, assume-se que quando a polimerase alcança uma lesão, ocorre uma tentativa de cópia, com inserção de um nucleotídeo presumivelmente aleatório oposto à lesão, o qual é todavia retirado pela atividade editorial. Este processo pode ocorrer repetidas vezes neste ponto, acarretando a formação de deoxiribonucleosídeos monofosfatos a partir de trifosfatos como resultado líquido de reação. Isto de fato foi observado, quando DNA polimerase

se I de E. coli copia DNA de fago ØX174 irradiado com UV, in vitro (VILLANI e col., 1978). Porém, a presença de lesões em DNA induz um processo denominado mecanismo SOS, o qual de alguma forma suprime a atividade editorial de polimerase III (VILLANI e col., 1978; BRIDGES, 1978), facilitando assim a polimerização através de lesão, às custas de uma maior probabilidade de erro de cópia (VILLANI & col., 1978). Um dado consistente com este modelo é o fato de DNA simples-fita de fago ØX-174, irradiado com UV e contendo portanto dímeros, ser copiado mais rapidamente quando a bactéria hospedeira é também previamente irradiada (CAILLET-FAUQUET e col., 1977). Por outro lado, a não-irradiação da hospedeira se traduz num bloqueio de síntese quando a polimerase atinge um dímero.

Além disso, este modelo explicaria as razões da ocorrência de reativação viral amplificada e o incremento de mutagênese viral, fenômenos estes já descritos no item anterior desta introdução.

Já no caso de eucariotos, apesar de ocorrerem fenômenos análogos, não foi possível até o momento detectar-se qualquer atividade editorial em DNA-polimerase, apesar de ensaios in vitro de polimerases de mamíferos, utilizando-se como molde DNA lesado de fago ØX-174, mostrarem que existe um bloqueio efetivo no ponto da lesão (MOORE e col., 1981).

De qualquer maneira, lesões recém-introduzidas no genoma afetam visivelmente a replicação in vivo de DNA, acarretando uma inibição da taxa global de

síntese, dependente da frequência das lesões presentes (EDENBERG, 1976; DONIGER, 1978; CORDEIRO-STONE e col., 1979). Além disso, o peso molecular de DNA nascente diminui, e a elongação desse DNA é deficiente (LEHMANN, 1972; CORDEIRO-STONE e col., 1979), ocorrendo a formação de lacunas neste DNA recém-sintetizado (CORDEIRO-STONE e col., 1979).

Os candidatos naturais responsáveis pela ocorrência de todos estes fenômenos são sem dúvida as lesões presentes no DNA-molde. Esta hipótese está de acordo com o fato da eliminação das lesões propiciar uma efetiva normalização de todos estes parâmetros, como foi verificado através de fotoreativação de dímeros produzidos por UV em células embrionárias de galinha (LEHMANN & STEVENS, 1975), células marsupiais (KRISHMAN & PAINTER, 1973), e células ICR 2A de sapo (ROSENSTEIN & SETLOW, 1980).

Por outro lado, um fenômeno há muito conhecido é o fato de cargas fracionadas de lesões produzirem um efeito deletério menor que no caso de uma carga única. Isto foi já observado por ELKIND & SUTTON (1960), que verificaram uma menor taxa de letalidade em células CHO de hamster chinês após doses parceladas de raios-X. Resultados análogos foram obtidos quando células eram submetidas a doses fracionadas de luz UV, neste caso ocorrendo uma elongação de DNA mais rápida, quando comparada com uma dose única de UV, equivalente à soma das doses fracionadas (D'AMBROSIO & SETLOW 1976).

Também longos tempos após a injúria celular, a replicação de DNA parece ter um comportamento aparentemente normalizado, ocorrendo uma recuperação nas taxas

de alongação de DNA (MEYN & HUMPHREY, 1971; LEHMANN & KIRKBELL, 1972; BUHL e col., 1973) e mesmo da taxa global de síntese (DAHLE e col., 1980). Estes dois parâmetros não são contudo necessariamente correlatos, uma vez que a normalização de alongação é mais rápida que para o caso da taxa de síntese de DNA. Explicações para a defasagem destes eventos baseiam-se na hipótese de ocorrer um "desligamento" de uma fração dos replicons atuantes no momento de injúria, os quais são eventualmente reativados longo tempo após o insulto (DONIGER, 1978), ou alternativamente na inibição, pela introdução de lesões, de iniciação de novos grupos de replicons (KAUFFMAN e col., 1980; KAUFFMAN & CLEAVER, 1981).

Uma explicação trivial que emerge desse quadro é a ocorrência de reparo-excisão das lesões ao longo do tempo após o insulto, ou entre as cargas fracionadas de lesões. Isto é aparentemente corroborado pelo fato de células XP não apresentarem recuperação destes parâmetros (MOUSTACCHI e col., 1979; LEHMANN e col., 1979). Todavia, se necessário, reparo-excisão não é suficiente para propiciar o retorno à normalização de síntese de DNA. Assim, células derivadas de pacientes de síndrome de Cockayne, outra desordem genética envolvendo hipersensibilidade à presença de lesões no genoma e que são capazes de efetuar reparo-excisão, não apresentam contudo uma recuperação de síntese de DNA nas mesmas condições (LEHMANN e col., 1979).

Além disso, células de roedores, que apresentam uma taxa de reparo-excisão de dímeros de pirimidina bastante limitada, tem uma notória recuperação de síntese de DNA, crescentes tempos após irradiação UV (MEYN e

col., 1977; DAHLE e col., 1980). Deve ser frisado que no caso específico de células V-79 de hamster chinês, foi detectada uma retomada de velocidade normal de alongação de DNA, longo tempo após a exposição a luz UV, mesmo quando na presença de uma frequência de dímeros no DNA-molde equivalente àquela que inicialmente promove uma inibição acentuada da velocidade de replicação (DAHLE e col., 1980).

Estes pontos levam a considerar a hipótese de ocorrer a indução de um mecanismo análogo ao processo SOS em bactérias, o qual permite às células de eucariotos contornar de forma eficiente as lesões presentes no DNA-molde, propiciando assim a duplicação integral do genoma, ainda que possivelmente as custas de uma taxa de mutação elevada. Isto explicaria a ocorrência de diferentes efeitos biológicos e bioquímicos, tais como a reativação viral e a taxa de mutação correspondente amplificadas, além da elevação da taxa de sobrevivência celular e da taxa de RPR de DNA, em diferentes sistemas estudados.

Já foi visto anteriormente que o mecanismo SOS em bactérias exige a ocorrência de síntese de DNA, enquanto que o oposto é necessário quando da recuperação de células de mamífero lesadas, em estado não proliferativo. No entanto, quanto ao hipotético mecanismo anteriormente descrito, o quadro é ainda obscuro.

Dessa forma, no caso de cargas fracionadas de lesões já foi sugerida a necessidade de haver síntese ativa de DNA para acarretar uma maior sobrevivência celular (DOMON & RAUTH, 1973; TODD, 1973), enquanto que amplificação de RPR já foi observada mesmo na ausência de síntese de DNA,

em condições análogas (D'AMBROSIO e col., 1978). Além do mais, foi observada também uma significativa alteração da taxa de sobrevivência de células insultadas em diferentes tempos da fase G_1 do ciclo celular, ocorrendo uma menor sensibilidade das células quando o genoma era lesado no meio de G_1 (MENECHINI & MENCK, 1981). Neste caso, a ocorrência de reparo-excisão não era suficiente per si para explicar o efeito observado.

Portanto, nota-se que este hipotético mecanismo induzido de síntese de DNA em células de mamíferos contendo um genoma lesado, ainda é um ponto bastante controverso e pouco consistente. Contudo, trata-se de uma questão extremamente relevante, uma vez que possivelmente envolve a ocorrência de erros de cópia em DNA replicado, com a consequente introdução de mutações na prole. Por outro lado, é importante ressaltar que existem indicações preliminares de que até 90% do genoma lesado poderia ser replicado a partir deste suposto mecanismo induzido (DONIGER & DIPAOLO, 1981).

Estas ponderações permitem compreender as razões do crescente interesse devotado em se obter mais informações acerca dessa área de investigação.

Assim, o objetivo desta tese foi essencialmente a obtenção de dados mais consistentes com relação aos eventos decorrentes da replicação de DNA num genoma previamente lesado com luz UV, já que os mecanismos íntimos deste processo permanecem obscuros, notadamente no caso de eucariotos. Fundamentalmente, procurou-se avaliar as consequências do encontro de um dímero no DNA-molde pela maquina-

ria de replicação, através de um enfoque mecanístico, buscando detectar possíveis estruturas anormais de replicação de DNA, através de uma metodologia que será descrita detalhadamente no decorrer da tese.

Uma vez que o dímero de pirimidina é uma lesão não codificadora, é plausível supor que sua presença resulte numa replicação de DNA envolvendo erros de cópia, erros estes que de algum modo se traduzem nas diferentes consequências biológicas anteriormente citadas para a célula lesada. Isto está de acordo com as evidências crescentes de que células de eucariotos poderiam ter um sistema induzido de RPR, possivelmente mutagênico, analogamente ao mecanismo SOS de bactérias. Este é um ponto extremamente importante, e também será abordado nesta tese.

II. MÉTODOS E MATERIAIS

1. CÉLULAS

1.1 Linhagens

Várias linhagens estabelecidas de células em cultura foram utilizadas nos diferentes experimentos deste trabalho:

a) XP12RO - fibroblastos humanos derivados de um paciente de xeroderma pigmentosum, doença genética autossômica recessiva rara, que confere ao portador uma extrema sensibilidade da pele à luz solar, com frequente ocorrência de câncer da pele. Estas células são deficientes em reparo-excisão de dímeros de pirimidina (CLEAVER, 1969), formados quando DNA é irradiado com luz UV. A linhagem aqui empregada é do grupo de complementação A (KRAMER e col., 1975), transformada in vitro por vírus SV40 (Simian Virus 40), e foi cedida pelo Dr. J. Cleaver da Universidade de San Francisco, California, U.S.A.

b) VA13 - fibroblastos humanos derivados de uma linhagem diplóide (WI38), transformados in vitro por SV40, e cedidas pelo Dr. L. Hayflick da Universidade de Stanford, Califórnia, U.S.A.

c) 3T3 - fibroblastos de embrião de camundongo, cedidos pelo Dr. H.A. Armelin da Universidade de São Paulo, Brasil.

d) Y-1 - células epiteliais de tumor de glândula suprarrenal de camundongo, cedidas pelo Dr. H.A. Armelin, da Universidade de São Paulo, Brasil.

e) CHO - (Chinese hamster ovary), células epiteliais de ovário de hamster chinês, cedidas também pelo Dr. H.A. Armelin, da Universidade de São Paulo, Brasil.

f) BHK - (baby hamster kidney) - fibroblastos renais de hamster sírio, cedidas pelo Dr. W. Colli, da Universidade de São Paulo, Brasil.

g) V-79 - fibroblastos pulmonares de hamster chinês, cedidas pelo Dr. M.W. Taylor, da Universidade de Indiana, Bloomington, U.S.A.

Todas as linhagens descritas crescem em monocamadas em placas de petri.

1.2 Cultivo

As linhagens de células descritas foram rotineiramente cultivadas em placas de petri (12, 20, 38 e 64 cm² de área) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), pH 7,0, suplementado com 10% de SB ou 10% de SFB, contendo 472 U/ml de penicilina, 94 µg/ml de estreptomicina e 24 µg/ml de ampicilina. A incubação era feita em uma câmara úmida em atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C. Quando as culturas atingiam a confluência, eram tripsinizadas e repicadas para novas placas de petri, em baixa densidade.

1.3 Marcação

Para a incorporação de precursores radioativos em DNA foi utilizada timidina-tritiada (timidina me-

til- ^3H , 10-60 $\mu\text{Ci/ml}$, 48,6-77,0 Ci/mMole) ou timidina- ^{14}C (timidina metil- ^{14}C , 0,15-1,0 $\mu\text{Ci/ml}$, 48,2-54 MCi/mMole) adicionadas ao meio normal de cultivo, e incorporadas por diferentes tempos. No caso de se efetuar incorporação de precursor pesado de DNA, foi utilizado meio de cultivo contendo 10^{-5}M de bromodeoxiuridina, 10^{-6}M de fluorodeoxiuridina, 10^{-5}M de uridina e opcionalmente 10^{-6}M de timidina- ^3H (50 $\mu\text{Ci/ml}$). A incorporação de precursor pesado de DNA foi feita por tempos variados.

1.4 Sincronização de ciclo celular

Células da linhagem 3T3 foram cultivadas por 30 horas em meio DME contendo 3% de SB. O meio foi retirado, e as culturas levadas duas vezes com TSF (tampão salina-fosfato, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, CaCl_2 1 mM, pH 7,0). Em seguida, foi repostado meio contendo 0,3% SB, e as culturas incubadas em condições normais por mais 24 horas. Efetuou-se então o estímulo para proliferação celular, retirando-se o meio pobre em SB e repondo-se meio normal contendo 10% SB. Nestas condições, as células atingem a fase S do ciclo celular em 15 horas.

1.5 Incubação de células na presença de cafeína

Nesse caso, era acrescentada cafeína 50mM em H_2O ao meio de cultura, para concentrações finais de 1 a 5 mM, incubando-se por diferentes tempos.

2. IRRADIAÇÃO COM LUZ UV A 254 nm

2.1 Condições de irradiação

Tomavam-se células em cultura, em placas de petri, em fase de crescimento exponencial. O meio era sugado, as células lavadas duas vezes com TSF pré-aquecido a 37°C, e repostado o mesmo tampão. A seguir, as culturas eram irradiadas com luz UV a 254 nm, fornecida por uma lâmpada germicida (GE G8T5) previamente aquecida por pelo menos 5 minutos. A irradiação era feita em uma caixa de madeira, adequada para este fim, a qual possibilita variar a distância da lâmpada em relação às culturas e que possui um anteparo móvel de luz. A distância entre a lâmpada e a cultura de células era calibrada, de modo a fornecer taxas de fluência de 0,1 ou 0,5 J.m⁻².s⁻¹. O tempo de exposição à luz UV era cronometrado, de forma a se obter fluências de 0 a 50 J/m².

Após a irradiação, o tampão era retirado das culturas, e repostado meio normal, reiniciando-se o cultivo das células nas condições usuais.

2.2 Dosimetria

A determinação da taxa de fluência fornecida pela lâmpada germicida foi efetuada de três formas:

a) Medidor de UV, modelo J.225 (Ultra violet Products, Inc. San Gabriel, California, U.S.A.).

b) Radiômetro, modelo 65A (Yellow Springs Instrument Co., Inc., Yellow Springs, Ohio, U.S.A.).

c) Actinometria de Ferrioxalato de Potássio (CALVERT & PITTS, 1966).

3. DETERMINAÇÃO DA TAXA DE SÍNTESE DE DNA

Células XP12RO submetidas a tratamentos alternativos com luz UV foram pulsadas por 10 minutos com 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina, em tempos crescentes após o tratamento com UV. Após o pulso, o meio radiativo foi sugado, as células lavadas por duas vezes com TSF, três vezes com TCA 5% gelado, e duas vezes com etanol 95%. Após secagem ao ambiente, adicionou-se 1,0 ml de NaOH 0,3N e incubou-se por 12 horas a 37°C. Tomou-se então alíquotas de 0,3 ml dos lisados, as quais eram depositadas sobre peças (área $\sim 2 \text{ cm}^2$) de papel Whatman 17 (Whatman Inc., Clifton, N.J.). Após secagem em estufa a 60°C, as peças foram depositadas em frascos de cintilação (Beckman Instruments, Inc.) contendo 5 ml de solução de cintilação (PPO, 4,0 g; POPOP, 0,1 g; tolueno, 1,0 l). Determinou-se então a radiatividade em um espectrofotômetro de cintilação líquida Beckman modelo L-200 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California). À outra alíquota (0,5 ml) dos lisados adicionou-se igual volume de NaOH 0,3 N, e mediu-se a absorbância em 260 nm, em um espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 (Varian Techtron, Pty. Ltd. Melbourne, Austrália). A razão entre a radiatividade e a absorbância em 260 nm foi tomada como uma medida de atividade específica de DNA.

4. ISOLAMENTO DE DNA

4.1 Extração e purificação

O protocolo neste caso era semelhante a um anteriormente descrito (MENECHINI, 1976). Células submetidas a diferentes tratamentos com luz UV, e tendo o DNA marcado com precursor radiativo, eram lavadas duas vezes com TSF, seguindo-se então basicamente a mesma rotina:

a) Tratamento brando das células com detergente (Triton X-100 0,5%, NaCl 0,1M, EDTA 10mM) por 1 minuto à temperatura ambiente. Este procedimento remove parcialmente a membrana citoplasmática e praticamente todos componentes do citoplasma, inclusive mitocôndrias (evitando assim que DNA mitocondrial mascare resultados). Os núcleos celulares permanecem todavia aderidos à placa de cultura.

b) Lise dos núcleos com detergente mais enérgico (SDS 0,5%, NaCl 0,1M, EDTA 10mM, Pronase 100 µg/ml), por 30 minutos a 37°C. Este tratamento solubiliza grande parte da cromatina, e a protease presente degrada tanto algumas proteínas envolvidas na estrutura da cromatina quanto nucleases endógenas, mantendo a integridade física do DNA.

c) Liberação de histonas por elevação da força iônica. Ao lisado obtido era acrescentado NaCl 5 M para uma concentração final de 1M, incubando-se a seguir por mais 15 minutos a 37°C. Após esta etapa o DNA não apresenta praticamente nenhuma associação com proteína, estando livre em

d) Desproteínização do lisado. O lisado obtido era coletado cuidadosamente para tubos com tampa rosqueada, seguindo-se uma ou duas desproteínizações com igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), com lenta agitação por 10 minutos. As fases eram separadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C, e a fase aquosa recolhida cuidadosamente para outro tubo com tampa rosqueada. Em seguida, DNA era precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado, com agitação lenta por 5 minutos. O precipitado era então peletado por centrifugação a 5000rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado, e o DNA seco ao ambiente. A seguir, o DNA era ressuspense em um volume arbitrário de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e estocado a 4°C.

4.2 Obtenção de DNA de alto peso molecular

Determinados experimentos feitos exigiam uma maior precisão na medida do peso molecular de DNA sintetizado após diferentes tratamentos com luz UV e/ou digestão enzimática. Nestes casos não era feita a purificação de DNA, uma vez que este procedimento termina por introduzir quebras na cadeia de DNA, devido à agitação mecânica, por mais cuidadoso que seja o manuseio do material. Assim, optou-se por uma simples lise em alcali do material nuclear, como descrito a seguir:

a) Isolamento de núcleos. Foi efetuado de forma idêntica à descrita no item 4.1(a) de "Métodos e Materiais".

b) Lise em alcali. Aos núcleos aderidos às placas era adicionado um volume arbitrário (0,3-1,0ml) de solução de lise (NaOH 0,3 N, NaCl 1,0 M, EDTA 10 mM) incubando-se por 30 minutos a 37°C ou 1 hora à temperatura ambiente. O lisado assim obtido contém DNA simples-fita de alto peso molecular, dissociado das demais moléculas biológicas presentes em solução.

5. ULTRACENTRIFUGAÇÃO DE DNA EM GRADIENTES LINEARES DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE

5.1 Obtenção de gradientes lineares

Os gradientes eram produzidos em um gerador de gradientes baseado no princípio de dois vasos comunicantes (capacidade total, 10 ml). O vaso contendo a solução de sacarose mais diluída (5%) era acoplado a uma bomba peristáltica e mantido sob agitação constante. O gradiente gerado era coletado para um tubo de polyallomer (5 ml, Beckman Instruments, Inc.) através de um capilar introduzido até o fundo do tubo. As composições das soluções de sacarose foram as seguintes:

a) gradientes neutros - 2 ml de solução contendo 5 ou 20% de sacarose, NaCl 0,1 M, EDTA 10 mM, pH 8,0, obtendo-se gradientes lineares de 4 ml, de 5 a 20% de sacarose.

b) Gradientes alcalinos - 2 ml de solução contendo 5 ou 20% de sacarose, NaOH 0,1 N, NaCl 0,1M, obtendo-se gradientes lineares de 4 ml, de 5 a 20% de sacarose.

c) Gradientes alcalinos lisados - 2,25 ml de soluções contendo 5 ou 20% de sacarose, NaOH 0,3 N, NaCl 1,0 M, EDTA 10 mM, obtendo-se gradientes lineares de 4,5 ml, de 5 a 20% de sacarose.

5.2 Condições de ultracentrifugação

Ao topo dos gradientes obtidos como descrito no item anterior, eram aplicadas alíquotas (50-250 μ l) de solução de DNA submetido a diferentes tratamentos com luz UV e/ou tratamentos enzimáticos, enquanto que no caso de lisados de DNA obtidos de acordo com o item 4.2 de "Métodos e Materiais", eram aplicadas alíquotas de 100-300 μ l de lisado.

Os gradientes eram centrifugados em rotor Spinco SW50.1 (Beckman Instruments, Inc., Spinco Division, Palo Alto, California), em ultracentrífuga Spinco L2-50, L3-50 ou L5-50b (Beckman Instruments, Inc., Spinco Division, Palo Alto, California). As condições de ultracentrifugação variavam, dependendo da natureza do gradiente:

a) gradientes neutros - centrifugação a 32.000 rpm, por 100, 150 ou 200 minutos a 20°C.

b) Gradientes alcalinos - centrifugação a 32.000 rpm, por 120, 180 ou 240 minutos, a 20°C.

c) Gradientes alcalinos lisados - centrifugação a 25.000 rpm, por 120 minutos a 20°C.

5.3 Coleta de gradientes e obtenção de perfis de sedimentação de DNA

Após ultracentrifugação, os gradientes eram coletados introduzindo-se até o fundo do tubo um capilar acoplado a uma bomba peristáltica. A coleta era feita sobre tiras de papel Whatman 17 (Whatman Inc., Clifton, N. J.), num procedimento análogo a um anteriormente descrito (CARRIER & SETLOW, 1971). Coletavam-se 25 a 40 frações de 5 a 7 gotas, diretamente sobre as tiras, as quais eram lavadas uma vez com TCA 5%, duas vezes com Etanol 95% e uma vez com acetona. Após secagem, as frações eram destacadas por corte e a radiatividade determinada em frascos de cintilação (Beckman Instruments, Inc.), contendo 5 ml de solução de cintilação (PPO, 4g; POPOP, 0,1g; tolueno 1 l), em um espectrofotômetro de cintilação líquida Beckman modelo L-200 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Califórnia). No caso de se efetuar dupla marcação no DNA (^3H e ^{14}C), as contagens de ^3H foram corrigidas para a sobreposição de emissão de radiatividade devida a ^{14}C , através de padrões de DNA marcados apenas com ^{14}C e contados nas mesmas condições. Assim é possível calcular um fator de correção, uma vez que se conhece a fração de radiatividade de ^{14}C que é contada artefactualmente na faixa de emissão de ^3H .

Uma vez conhecidos os valores de cpm em cada fração do gradiente, os perfis de sedimentação de DNA eram determinados, normalizando-se os valores individuais de radiatividade obtidos, em relação ao total de radiatividade presente ao longo do gradiente. Os valores de cpm de

cada fração eram nesse caso expressos como percentagem da somatória de cpm de todas as frações, sendo este último valor tomado como 100%.

6. ESTIMATIVA DE PESO MOLECULAR DE DNA

6.1 Princípios do método

Para uma série homóloga de polímeros, como é o caso de DNA em solução, é possível relacionar o peso molecular da macromolécula (M) e seu coeficiente de sedimentação (S), através da expressão descrita por STUDIER (1965). Nesse caso, temos que

$$S = K. (M)^{\alpha}$$

onde K e α são constantes, e dependem da conformação física de macromolécula, isto é, valores diferentes de K e α são obtidos para DNA nativo (dupla-fita) ou denaturado (simples-fita). Porém, a estimativa de S ao longo de um gradiente de sacarose é afetada por fatores tais como variação de viscosidade e densidade do meio, tornando o cálculo numérico desse valor por demais complicado para uma aplicação rotineira.

Uma aproximação bastante razoável é obtida quando as condições de centrifugação da solução de macromoléculas (no caso, DNA), são padronizadas. Dessa forma, uma vez que a variação das densidades das partículas presentes é muito baixa, obtêm-se taxas de sedimentação praticamente constantes, ao longo do gradiente (MARTIN & AMES, 1961).

Assim, é possível estabelecer-se a proporcionalidade entre S e a distância percorrida pela macromo

lêcula durante a centrifugação, expressa como o número da fração do gradiente em que a partícula está presente (N), número este contado a partir do tópo do gradiente.

Temos assim que

$$S_1/S_2 = N_1/N_2$$

e uma vez conhecida a relação entre S e M , obtemos a expressão

$$N_1/N_2 = \left| M_1/M_2 \right|^\alpha$$

Verifica-se portanto que se dispusermos do valor de α e da posição de sedimentação (N_1) de um DNA de peso molecular conhecido (M_1), torna-se possível calcular o peso molecular de DNA (M_2) correspondente a uma fração qualquer (N_2) do gradiente.

O valor de α pode ser estimado se compararmos as posições de sedimentação (N_1 e N_2) de padrões de DNA de pesos moleculares diferentes (M_1 e M_2). Para o caso de gradientes alcalinos e alcalinos lisados, o valor de calculado foi de 0,400, valor este idêntico ao determinado por Studier (STUDIER, 1965), enquanto que para gradientes neutros foram obtidos valores de 0,326 e 0,312, alternativamente, dependendo das condições de centrifugação.

Como padrões de peso molecular de DNA foram utilizados DNA de fago T_4 ($1,1 \times 10^8$ daltons), fago T_7 ($2,5 \times 10^7$ daltons), fago λ ($3,26 \times 10^7$ daltons) e fragmentos de restrição de DNA de fago λ clivado por $EcoR_1$ (13,7; 4,74; 3,73; 3,48; 3,02 e $2,13 \times 10^6$ daltons). Os valores de peso molecular descritos correspondem a DNA nativo (dupla-fita).

6.2 Cálculo do peso molecular médio de DNA

Como foi dito anteriormente, é factível determinar o peso molecular de DNA correspondente a uma determinada fração (M_i) de um gradiente efetuado em condições padronizadas. Por outro lado, os perfis de sedimentação de DNA obtidos experimentalmente fornecem a quantidade relativa de radiatividade presente numa dada fração (r_i). Assim, é possível calcular o peso molecular médio da população de moléculas de DNA presentes no gradiente (EHMANN & LETT, 1973).

Este cálculo era efetuado rotineiramente de quatro formas:

a) Peso molecular médio de DNA, baseado na distribuição do número de moléculas ao longo do gradiente (M_n), onde

$$M_n = \frac{\sum r_i}{\sum \left(\frac{r_i}{M_i} \right)}$$

b) Peso molecular médio de DNA, baseado na distribuição da massa de moléculas ao longo do gradiente (M_w), onde

$$M_w = \frac{\sum (r_i \cdot M_i)}{\sum r_i}$$

c) Peso molecular médio de DNA, baseado na posição mediana da distribuição de radiatividade ao longo do gradiente ($M_{1/2}$).

Este cálculo só é válido para populações gaussianas de moléculas de DNA (EHMANN & LETT, 1973). Neste caso, é calculado o peso molecular de DNA correspondente à

fração mediana da distribuição de radiatividade ($M_{1/2}$), podendo então ser obtido M_n , uma vez que

$$M_n = 0,596 \cdot M_{1/2} \quad (\text{EHMANN \& LETT, 1973})$$

d) Peso molecular de DNA correspondente ao pico de radiatividade no gradiente (M_p). Este valor só é significativo quando a população de moléculas de DNA tem uma distribuição aproximadamente monodispersa.

Para o cálculo de M_n , como descrito no item a, eram descontadas as 3-5 primeiras frações do topo do gradiente. Isto é devido à ocorrência de contaminação com radiatividade solúvel, a qual introduz erros grosseiros no cálculo do peso molecular médio de DNA da população.

7. ULTRACENTRIFUGAÇÃO DE DNA EM GRADIENTES ISOPÍCNICOS DE CsCl

7.1 Preparação dos gradientes e condições de centrifugação

Em tubos de nitrocelulose (10 ml, Beckman Instruments, Inc.) eram feitas soluções de 7,6 g de CsCl em tampão Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, contendo uma quantidade arbitrária de solução de DNA (volume final de tampão = 5,7ml). Dessa forma, eram obtidos 7,6 ml de solução, com uma densidade inicial de 1,720-1,726. O monitoramento da densidade da solução (ρ) era feito indiretamente, através de medidas do índice de refração (n) de alíquotas de solução, assumindo-se que $\rho^{25} = 10.8601n^{25} - 13.4974$ (Handbook of Biochemistry, 1970). Em seguida, era adaptada à boca do tubo uma tampa de

metal, e adicionado óleo mineral (Nujol) até o t $\hat{o}$ po do tubo, com auxílio de uma seringa. O tubo era então herm $\acute{e}$ ticamente fechado, e acondicionado em um rotor Spinco 50 Ti (Beckman Instruments, Inc., Spinco Division, Palo Alto, Calif $\acute{o}$ rnia).

Procedia-se então à ultracentrifugação a 37.000 rpm, por 42-44 horas, a 22°C, em ultracentrífuga Spinco modelo L3-50 (Beckman Instruments, Inc., Spinco Division, Palo Alto, Calif $\acute{o}$ rnia).

7.2 Determinação dos perfis de bandejamento de DNA em gradientes de densidade de CsCl

Ap $\acute{o}$ s a ultracentrifugação, os tubos eram cuidadosamente recolhidos do rotor e as tampas metálicas e a camada de óleo mineral retiradas do t $\hat{o}$ po do gradiente. A seguir, eram coletadas 38-42 frações de 5 g $\hat{o}$ tas, determinando-se os perfis de bandejamento de DNA através da medida de radiatividade em cada fração. Os procedimentos de coleta e medida de radiatividade foram em tudo idênticos aos descritos no ítem 5.3 de "Métodos e Materiais". À parte foram centrifugados DNA's marcados por um longo período com precursor pesado (BUdr + ^3H -Tdr, 10:1) (DNA de densidade híbrida) e DNA's marcados com precursor leve (^3H -Tdr) (DNA de densidade normal), usados como marcadores de densidade.

7.3 Recuperação de DNA de alto peso molecular após bandejamento em gradientes de densidade de CsCl

Nesse caso, eram coletadas, após ultracentrifugação, 40 frações de 5 gôtas para cada gradiente, recolhendo-se as frações em tubos de ensaio. Este procedimento foi efetuado da forma mais cuidadosa possível, de modo a evitar ao máximo a introdução de quebras mecânicas nas moléculas de DNA. Determinava-se então os perfis de bandejamento de DNA, tomando-se uma alíquota (10 μ l) de cada fração e depositando-se sobre tiras de papel Whatman 17, de forma análoga à descrita no item 5.3 de "Métodos e Materiais". As frações correspondentes a DNA de densidade híbrida (ρ 1,770 - 1,755) e DNA de densidade intermediária (ρ 1,740-1,725) eram somadas em "pool" e dializadas contra tampão de incubação de S_1 -endonuclease (Acetato de sódio 30 mM, NaCl 0,3M, $ZnSO_4$ 1mM, glicerol 5%, pH 5,0), por 6 horas, à temperatura ambiente. O tampão de diálise era então renovado e os materiais dializados por mais 12 horas, a 4°C. As posições de bandejamento de DNA híbrido (ρ = 1,7650) e DNA de densidade normal (ρ = 1,7250) foram estabelecidas de forma análoga à descrita no item anterior. As frações que não tomavam parte nos "pools" foram usadas para se determinar o gradiente de densidade, com auxílio de refratômetro, de maneira idêntica à descrita no item 6.1 de "Métodos e Materiais", observando-se $\rho_{\text{máx}} \sim 1,80$ e $\rho_{\text{min}} \sim 1,65$.

8. CARACTERIZAÇÃO DE LACUNAS EM DNA

8.1 Ensaio com S_1 -endonuclease de *Aspergillus oryzae*

Tomava-se 50 μ l de soluções de DNA (contendo menos de 2 μ g de DNA), obtidas de acordo com o item 4.1 de "Métodos e Materiais", e incubava-se com 200 μ l de tampão (acetato de sódio 30 mM, NaCl 0,3M, $ZnSO_4$ 1 mM, glicerol 5%, pH 5,0) contendo 0-60 U/ml de S_1 -endonuclease, por 30 minutos a 35°C. Uma unidade de atividade nucleolítica corresponde à quantidade de enzima que solubiliza 1 μ g de DNA simples-fita em 1 minuto, a 45°C, em tampão acetato de sódio 30 mM, NaCl 50 mM, $ZnSO_4$ 1 mM, glicerol 5%, pH 4,6 (VOGT, 1973). O término de incubação era efetuado pela deposição das amostras em banho de gelo e adição de 50 μ l de tampão TRIS 0,5M, EDTA 50 mM, pH 7,5. Tomavam-se então alíquotas do material (100-250 μ l) as quais eram depositadas sobre gradientes neutros de sacarose, e submetidas à ultracentrifugação, como descrito no item 5 de "Métodos e Materiais", determinando-se os perfis de sedimentação de DNA's submetidos a diferentes tratamentos com UV e/ou digestão enzimática.

Para a determinação da sensibilidade de DNA híbrido e de densidade intermediária à ação de S_1 -endonuclease, obtidos como descrito no item 6.3 de "Métodos e Materiais", tomava-se 150 μ l de DNA dializado como descrito e adicionava-se 50 μ l de tampão de incubação de S_1 -endonuclease, contendo 0 ou 80 U/ml de enzima. Os procedimentos para digestão enzimática e determinação de perfis de sedimentação de DNA foram em tudo análogos aos descritos anteriormente.

8.2 Determinação da frequência de clivagens produzidas em DNA simples-fita por concentrações crescentes de S_1 -endonuclease

Células XPl2RO foram incubadas por 24 horas em meio de cultura contendo 1 μ Ci/ml de ^3H -Timidina. A seguir, o DNA foi extraído e purificado como descrito no item 4.1 de "Métodos e Materiais". O DNA dissolvido em tampão TRIS 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, foi então denaturado pela adição de NaOH 1,0N, para uma concentração final de 0,1N, incubando-se por 10 minutos a 25°C. O pH foi então ajustado para 7,4 pela adição de HCl 1,0M, e alíquotas (50 μ l) dessa solução (4,4 μ g DNA/ml) foram incubadas com concentrações crescentes de S_1 -endonuclease (0-1,0 U/ml) em condições idênticas às descritas no item anterior. Seguiu-se centrifugação das amostras em gradientes alcalinos de sacarose, por 120 minutos (controle não tratado com nuclease), ou 240 minutos (séries incubadas na presença de enzima), determinando-se os pesos moleculares médios de DNA, conforme descrito no item 5 de "Métodos e Materiais".

O cálculo do número de quebras introduzidas pela nuclease foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{quebras}/10^8 \text{ d} = \left| \left(\frac{M_C}{M_T} - 1 \right) \right| \cdot \frac{100}{M_C}$$

Onde M_C = Mn de DNA não tratado com enzima, em 10^6 d
 M_T = Mn de DNA tratado com enzima, em 10^6 d .

8.3 Frequência de clivagens produzidas por S₁-endonuclease em crescentes concentrações de DNA simples-fita

Nesse caso, foi utilizado o DNA marcado obtido no item anterior, diluído por sua vez para uma concentração de 2,0 µg/ml, pela adição de tampão TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0. A alíquotas dessa solução era então adicionado DNA de timo, denaturado previamente como descrito anteriormente, para concentrações finais de 2,0 a 68,4 µg DNA/ml.

A medida das concentrações de DNA em solução foi efetuada espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635 (Varian Techtron Pty. Ltd. Melbourne, Austrália), sabendo-se que na ausência de proteínas em solução, $Abs_{260nm} = 1,0$ para uma solução de 50 µg DNA nativo/ml. O ensaio com S₁-endonuclease (0,11 U/ml), a medida dos pesos moleculares de DNA e o cálculo do número de quebras foram em tudo análogos aos procedimentos descritos no item anterior.

9. COMPARAÇÃO ENTRE O PESO MOLECULAR DE DNA SINTETIZADO APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS COM UV E A DISTÂNCIA MÉDIA INTERDÍMEROS NO DNA-MOLDE

Foram utilizadas células V-79 contendo um DNA-molde previamente marcado por 36 horas (1 µCi/ml) ou 15 horas (0,15 µCi/ml) de ¹⁴C-Timidina. Após diferentes tratamentos com luz UV, as células foram repostas em meio contendo 0 ou 2 mM de cafeína por 30 minutos, e a seguir efetuou-se um pulso de 1 hora (30 µCi/ml) ou 30 minutos (20 µCi/ml)

de ^3H -Timidina em meio contendo cafeína nas mesmas condições, para marcação do DNA recém-sintetizado. Os DNA's foram então extraídos e purificados como descrito no item 4.1 de "Métodos e Materiais".

As soluções de DNA assim obtidas, dissolvidas em tampão TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, foram então incubadas na presença de extrato de Micrococcus luteus, contendo atividade UV endonucleolítica, segundo o esquema descrito a seguir:

DNA (em TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0)	- 100 μl
UV endonuclease (em tampão fosfato 5 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,5) ou apenas tampão	- 125 μl
Tampão fosfato 50 mM, NaCl 0,3M, EDTA 10 mM, pH 6,5	- 25 μl

Incubava-se as amostras por 1 hora a 37°C , e o término da reação era efetuado pela adição de 5 μl de NaOH 5N.

Os DNA's eram então submetidos à ultracentrifugação em gradientes alcalinos de sacarose, determinando-se os perfis de sedimentação de DNA- ^{14}C (molde) e DNA- ^3H (sintetizado após UV), da maneira descrita no item 4.1 de "Métodos e Materiais". Dessa forma, o peso molecular observado para DNA- ^{14}C após tratamento enzimático corresponde à distância interdímeros média e pode ser comparado diretamente com o peso molecular de DNA- ^3H recém-sintetizado. Além disso, é possível determinar a frequência de dímeros no DNA- ^{14}C (molde), comparando-se os pesos moleculares obtidos com ou sem tratamento enzimático. Nesse caso,

$$f_d \text{ (dímeros/10}^6 \text{ daltons)} = \left(\left| \frac{M_c}{M_T} - 1 \right| \cdot \frac{1}{M_c} \right) - AI$$

onde

M_c = peso molecular de DNA não tratado com enzima, em 10^6 daltons

M_T = peso molecular de DNA tratado com enzima, em 10^6 daltons

AI = atividade nucleolítica inespecífica da enzima, determinada por digestão de DNA não irradiado com UV, nas mesmas condições.

A partir de f_d é possível obter a distância média interdímeros (em 10^6 d), nesse caso igual a $1/(f_d)$.

10. MATERIAIS

Para o cultivo de células, DME e SB eram da Grand Island Biological Co. ou da Flow Laboratories, enquanto que SFB era proveniente da Grand Island Biological Co. Flow Laboratories ou Laborclin. Penicilina e Estreptomicina eram da Fontoura Wyeth e Ampicilina da Squibb. As seguintes substâncias eram da Sigma Chemicals: BUdr, FUdr, Ur, Cafeína, Teofilina, PPO, Sacarose e DNA de timo purificado. Os detergentes Triton X-100 e SDS também eram da Sigma Chemicals. TRIS era da Merck, EDTA da Riedel - de Haën AG, Nujol da I.Q.F. Schering S.A., e POPOP da Beckman. Quanto à procedência dos sais, ácidos e bases, Na_2HPO_4 , CaCl_2 , NaOH e HCl eram da Merck, enquanto que KCl e KH_2PO_4 eram da Carlo Erba. NaCl era proveniente da Merck, Qeel ou BDH, TCA da Baker ou Reagen, ZnSO_4 da Fisher Sci.Co. e acetato de sódio da Baker. CsCl

(optical grade) era da The Harshaw Chemical Co. No que se refere a solventes, Etanol absoluto e glicerol eram da Merck, tolueno e clorofórmio da Merck ou Carlo Erba, Álcool isoamílico da Baker, Etanol 95% da Comp. Nac. Álcool (Zulu) e Acetona da Usina Colombina.

Os radioisótopos usados foram timidina metil- ^3H da New England Nuclear (48,4 - 77,0 Ci/mMole) ou Schwarz/Mann Radiochemical (55-60 Ci/mMole) e timidina metil- ^{14}C , da New England Nuclear (48,2 - 54 mCi/mMole). Quanto a enzimas, pronase era da Calbiochem., Eco R_1 da Sigma Chemicals e tripsina da Flow Laboratories. S_1 -endonuclease de Aspergillus oryzae foi obtida alternativamente da Sigma Chemicals ou purificada em nosso laboratório pela Dra. Mari-la Cordeiro-Stone, a partir de α -amilase (de acordo com VOGT, 1973) até inclusive a etapa de cromatografia em dietilaminoetil (DEAE) - celulose. As frações exibindo picos de atividade nucleolítica sobre DNA simples-fita foram agrupadas e concentradas por ultrafiltração, com um kit de separação molecular imersível (Millipore Corp. Bedford, Mass., nmw $\ell = 10.000$).

UV endonuclease de Micrococcus luteus foi parcialmente purificada em nosso laboratório por C.F.M.Menck até a etapa correspondente a fração II do método descrito por CARRIER & SETLOW (1970).

III. RESULTADOS

1. TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS IRRADIADAS COM UV

A figura 1 mostra a cinética de inibição provocada por duas doses diferentes de UV na incorporação de precursor radiativo de DNA em células XP12RO. Uma vez que estas células são deficientes em reparo excisão, os valores de incorporação encontrados foram assumidos como se devendo exclusivamente à síntese semiconservativa de DNA. No caso, a comparação dos níveis de incorporação de células irradiadas com o nível de incorporação de controles não irradiados evidencia um significativo efeito de irradiação sobre a síntese global de DNA. Observa-se que após uma dose de 5 J/m^2 ocorre uma crescente inibição de síntese, atingindo-se um platô em torno de 35 minutos após a irradiação, com um valor basal de síntese de cerca de 35% do controle não irradiado. Por outro lado, uma dose de $12,5 \text{ J/m}^2$ fornece um resultado análogo, se bem que mais drástico, uma vez que o platô é alcançado já em 15 minutos, com uma taxa de síntese de 20% frente ao controle.

Estes resultados são análogos a outros anteriormente obtidos em células de hamster chinês (DONIGER, 1978), e sugerem que a presença de dímeros no DNA-molde resulta num efeito inibitório na capacidade de síntese de DNA em células previamente irradiadas.

FIGURA 1. Taxa relativa de síntese de DNA em diferentes tempos após irradiação UV. Celulas XP12RO foram irradiadas com 5,0 (○) ou 12,5 J/m² (●) e pulsadas em vários tempos após UV com 10 μ Ci/ml de ³H-Tdr por 10 minutos. Controles não-irradiados foram efetuados nos mesmos tempos. Os valores de incorporação específica (cpm de ³H-Tdr incorporados em DNA por unidade de Abs₂₆₀) foram calculados como descrito em "Métodos e Materiais" e normalizados com os valores dos controles. Os tempos indicados correspondem aos meio-terminos dos períodos de pulso após irradiação UV.

2. PESO MOLECULAR INICIAL E TAXA DE ELONGAÇÃO DE DNA RECÉM-SINTETIZADO EM CÉLULAS IRRADIADAS COM UV

Outro expressivo efeito de irradiação pré via com UV sobre a replicação é mostrado nas figuras 2 e 3. Verifica-se que tanto o peso molecular do DNA nascente (Figura 2) quanto a taxa de elongação desse mesmo DNA (ver Figura 3) são nitidamente afetados pela irradiação prévia com UV. Este fenômeno é observado, não obstante o fato de haverem sido efetuados pulsos com precursor marcado e caças mais longos nas células irradiadas, de forma a se obter uma quantidade de DNA sintetizado durante o período equivalente às culturas não irradiadas. Assim, nota-se que mesmo para uma mesma quantidade global de DNA sintetizado, o peso molecular médio (Mn) de DNA nascente em células irradiadas ($16,5 \times 10^6$ d) é menor que no caso dos controles ($34,8 \times 10^6$ d), exibindo um pico no perfil de sedimentação na posição de $12,5 \times 10^6$ d (Mp).

Uma aparente discrepância nos dados apresentados prende-se ao fato de ter-se efetuado um pulso somente 3 vezes mais longo (15 minutos para 45 minutos, ver figura 2) nas células irradiadas, isto apesar do nível basal de síntese de DNA observado para a mesma dose de $12,5 \text{ J/m}^2$ ser de apenas 20% do controle, conforme mostra a figura 1. Deve ser lembrado porém que no caso de medir-se o peso molecular médio de DNA nascente (Figura 2), o pulso foi efetuado imediatamente após a irradiação com UV, não tendo sido portanto totalmente expressa a inibição de síntese de DNA, pelo menos durante os primeiros 15 minutos após a irradiação.

% CPM

FIGURA 2. Peso molecular de DNA nascente em células irradiadas ou não com luz UV. Células XP12RO foram irradiadas com 0 (A) ou 12,5 J/m² (B) e pulsadas com 30 µCi/ml de ³H-Tdr por 15 e 45 minutos, respectivamente. As células foram lisadas como descrito em "Métodos e Materiais", e um lisado idêntico foi preparado de células que incorporaram ¹⁴C-Tdr por 24 horas. Aliquotas dos lisados contendo DNA-³H e DNA-¹⁴C foram depositadas sobre gradientes alcalinos de sacarose como descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda. (··), DNA-¹⁴C; (-), DNA-³H.

FIGURA 3. Elongação de DNA nascente, em células irradiadas ou não com luz UV. Células XPL2RO foram irradiadas com 0 (○) ou $12,5 \text{ J/m}^2$ (●) de luz UV e pulsadas com $30 \mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H.Tdr}$ por 15 e 45 minutos, respectivamente. O meio radiativo foi retirado e reposto meio fresco contendo 10^{-5}M Tdr, e após incubação por vários tempos as células foram lisadas e o DNA sedimentado em gradientes alcalinos de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais". Uma alíquota de um lisado contendo DNA- ^{14}C uniformemente marcado foi também depositada sobre cada gradiente. Os valores de Mn de DNA- ^3H e DNA- ^{14}C foram determinados como descrito em "Métodos e Materiais". A razão $[\text{Mn}(\text{DNA-}^3\text{H})]/[\text{Mn}(\text{DNA-}^{14}\text{C})]$ (extensão relativa) foi plotada vs. o tempo de caça no meio não radiativo.

Outro dado que caracteriza um processo alterado de replicação de DNA após irradiação UV é o da figura 3. Nota-se que a taxa de elongação de DNA também é severamente inibida após uma irradiação com $12,5 \text{ J/m}^2$ de UV. Assim, enquanto em células não irradiadas o DNA sintetizado alcança um Mn equivalente à 75% do Mn do DNA parental já em 2 horas, em células irradiadas o Mn do DNA sintetizado não chega sequer a 50% do valor do Mn do DNA parental mesmo após 6 horas (ver figura 3).

Novamente, a presença de dímeros no genoma resulta numa evidente influência na eficiência de replicação de DNA. Porém, a partir desse conjunto de dados não é possível nenhuma conclusão definitiva acêrca do mecanismo de ação dos dímeros presentes no DNA-molde, sobre a maquinaria de replicação.

3. SÍTIOS SENSÍVEIS À S_1 -ENDONUCLEASE EM DNA SINTETIZADO APÓS UV

3.1 Perfil de sedimentação de DNA após tratamento enzimático

Com o intuito de verificar a presença de sítios sensíveis à S_1 -endonuclease em DNA replicado após irradiação UV, efetuou-se o protocolo descrito em "Métodos e Materiais" e cujos resultados aparecem na figura 4. Verifica-se uma visível alteração no perfil de sedimentação em gradiente neutro de sacarose, de DNA sintetizado após UV nativo, quando tratado com S_1 -endonuclease, enquanto que DNA sintetizado antes de UV é praticamente refratário à enzima.

; CPM

Nº FRAÇÕES

FIGURA 4. Ação da S_1 -endonuclease sobre DNA nascente dupla-fita de células XP12RO. Em A, as células foram pulsadas por 20 minutos ($28 \mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-Tdr}$) e irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$. Em B, as células foram irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ e pulsadas com $^3\text{H.Tdr}$ por 45 minutos. O DNA foi extraído e incubado na presença (●) ou ausência (○) de 20U de S_1 -endonuclease / ml, por 30 minutos a 35°C , como descrito em "Métodos e Materiais", e em seguida centrifugado em gradientes neutros de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais".

Assim, nota-se que o perfil de sedimentação no primeiro caso é francamente bimodal, após digestão enzimática, contendo duas populações distintas de DNA, uma de elevado peso molecular (H-DNA) e outra de peso molecular bem menor (L-DNA) (ver figura 4).

Uma vez que a enzima cliva específica - mente DNA simples-fita, e as condições de centrifugação são neutras, alterações no perfil de sedimentação só podem ser devidas à ocorrência de duplas quebras na cadeia de DNA sintetizado após UV. Um resultado semelhante foi observado anteriormente (MENECHINI, 1976), ao se tratar DNA replicado após UV em células humanas WI-38, com endonuclease de Neurospora crassa, também específica para DNA simples fita. A interpretação dada, naquele caso, é a de que a nuclease estaria clivando DNA simples-fita oposto a lacunas formadas em DNA recém-sintetizado, numa região oposta a dímeros no DNA-molde. Dessa forma, a clivagem enzimática das lacunas daria origem a duplas-quebras nas fitas de DNA, as quais seriam detectadas em gradientes neutros de sacarose (MENECHINI, 1976).

De qualquer maneira, perfis de sedimentação bimodais foram observados, mesmo com uma ampla variação tanto da concentração de S_1 -endonuclease como do tempo de incubação de DNA sintetizado após UV, com a nuclease (ver Tabela I).

Por outro lado, a hipótese de dímeros constituírem-se per si em sítios sensíveis à S_1 -endonuclease pode ser descartada, uma vez que DNA sintetizado antes de irradiação com luz UV é praticamente refratário à enzima, con

TABELA I

Mn de DNA após tratamento com S₁-endonuclease

DNA	Mn x 10 ⁶ d	DNA total (%)	Nº de determinações
H-DNA (não tratado)	57,4 ± 3,9	100	2
H-DNA (tratado)	43,1 ± 5,0	71,9 ± 6,6	10
L-DNA (tratado)	2,8 ± 0,5	28,1 ± 6,5	10

Os dados são de diferentes experimentos análogos ao da Figura 4, porém variando-se a concentração de enzima (5-60 U/ml) ou tempo de incubação (5-60 minutos). Os valores de Mn para os picos das regiões H e L, indicados na Figura 4B, foram calculados como descrito em "Métodos e Materiais".

forme descrito na figura 4. Nesse caso, o controle foi irradiado com a mesma dose de UV ao final do pulso com precursor marcado. Isto foi também observado no caso de DNA uniformemente marcado por um longo período e posteriormente irradiado com UV. Também neste caso, não se observou nenhuma alteração no perfil de sedimentação, após tratamento enzimático nas mesmas condições (resultados não apresentados).

Este conjunto de dados é consistente com a hipótese de ocorrerem lacunas em DNA sintetizado após UV, possivelmente em regiões opostas a dímeros presentes no DNA-molde.

3.2 Perfil de sedimentação de DNA após crescentes doses de UV. Correlação com o peso molecular de DNA recém-sintetizado

Na figura 5 aparecem os resultados obtidos quando DNA recém-sintetizado após crescentes doses de UV foi submetido à digestão com S_1 -endonuclease. Também neste caso os perfis de sedimentação de DNA, após tratamento enzimático, apresentaram características de bimodalidade, de forma cada vez mais evidente à medida que aumentava a dose de UV inicialmente fornecida. Além disso, o peso molecular médio de DNA nascente simples-fita após UV mostrou-se inversamente proporcional à dose de UV.

Portanto, uma frequência crescente de dímeros presentes no DNA-molde leva a um aumento do número de sítios sensíveis à S_1 -endonuclease em DNA sintetizado após UV, assim como acarreta uma taxa média de replicação de DNA cada

FIGURA 5. Ação de S₁-endonuclease em DNA nascente dupla-fita e Mn de DNA nascente, após doses crescentes de luz UV. Células XP12RO foram irradiadas com UV para as doses indicadas, pulsadas por 20 minutos com ³H-Tdr (50 µCi/ml) e o DNA extraído, como descrito em "Métodos e Materiais". A seguir, o DNA foi submetido a gradientes alcalinos de sacarose ou alternativamente tratado com 0(o) ou 60U S₁-endonuclease/ml (●) por 30 min a 35°C e submetido a gradientes neutros de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda.

vez mais reprimida.

3.3 Efeito das condições de pulso com precursor marcado

É válido questionar a razão de uma parte do DNA recém-sintetizado após UV se manter refratário à digestão com S_1 -endonuclease.

Uma possível explicação para o caráter bimodal do perfil de sedimentação de DNA sintetizado após UV, quando tratado com S_1 -endonuclease, prende-se ao fato do pulso com precursor marcado ter sido efetuado imediatamente após a irradiação UV. Assim, é plausível supor que uma quantidade significativa de DNA replicado após UV não teria alcançado nenhum dímero na cadeia-molde durante o período de pulso. Além disso replicons adjacentes maduros poderiam sofrer o processo de junção durante o pulso, sem que houvesse passagem por dímeros no DNA parental. Estes dois fatores produziriam DNA marcado, sendo este porém refratário ao tratamento com S_1 -endonuclease, dando assim origem a H-DNA.

Uma maneira de descartar esta hipótese seria a de marcar o DNA recém-sintetizado apenas 30 minutos após a irradiação UV, tempo este suficiente para que todos os replicons ativos atingissem pelo menos um dímero na cadeia -molde, levando-se em conta a dose de UV fornecida. A figura 6 mostra o resultado desse procedimento, comparado a um perfil obtido quando DNA é marcado imediatamente após a irradiação: a distribuição bimodal permanece essencialmente a mesma, ocorrendo todavia um pequeno decréscimo da população de H-DNA. Assim, no caso de efetuar-se um pulso imediatamente após UV, obtém-se uma quantidade de H-DNA (correspondendo às frações 1

FIGURA 6. Ação de S_1 -endonuclease em DNA nascente dupla-fita em diferentes condições após irradiação UV. Células XP12RO foram irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ de luz UV, seguindo-se dois procedimentos alternativos: em A, efetuou-se um pulso de 45 minutos com $^3\text{H.Tdr}$ ($30 \mu\text{Ci}/7 \text{ ml}$) imediatamente após a irradiação; em B, as células foram incubadas por 30 minutos em meio normal e só então submetidas a um pulso nas mesmas condições que A. Os DNA's foram extraídos e tratados com o ($\bullet$) ou $20 \text{ U } S_1$ -endonuclease/ml ($\circ$) por 30 minutos a 35°C e submetidos a ultracentrifugação em gradientes neutros de sacarose, conforme descrito em "Métodos e Materiais". As somatórias de % cpm calculadas para as frações (1-15) e (16-27) após tratamento enzimático foram respectivamente: em A, 61% e 39%; em B, 51% e 49%. Sedimentação é da direita para a esquerda.

% CPM

Nº FRAÇÕES

FIGURA 7. Formação de L-DNA após tratamento de DNA recém-sintetizado com S_1 -endonuclease. Células XP12RO foram irradiadas com 0 (A), 12,5 (B), 25 (C) e 50 J/m^2 (D), incubadas por 30 minutos em meio normal e então pulsadas por 30 minutos com 60 $\mu Ci/ml$ de 3H -Tdr. O DNA foi extraído e incubado com (●) ou sem (○) 20 U S_1 -endonuclease/ml por 30 minutos a 35°C e centrifugado em gradientes neutros de sacarose, em procedimentos idênticos aos descritos em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda.

até 15) equivalente a 61% do total de DNA, enquanto que L-DNA (frações 16 a 27) contém os restantes 39%. Porém, uma pré-incubação de 30 minutos após UV, antes de se efetuar um pulso nas mesmas condições, fornece após tratamento enzimático duas populações equivalentes, onde H-DNA corresponde a 51% e L-DNA a 49% do DNA-total (ver Figura 6).

Além disso, esta distribuição equitativa entre H-DNA e L-DNA se mantém mesmo para doses de 50 J/m^2 , conforme ilustra a figura 7. Para esta dose de UV mais elevada, a possibilidade da maquinaria de replicação não encontrar nenhum dímero nos primeiros 30 minutos é virtualmente nula.

3.4 Correlação entre o peso molecular de L-DNA e a dose de UV fornecida

Experimentos preliminares (não apresentados) indicaram que o peso molecular de L-DNA formado após tratamento enzimático, decrescia com o aumento da dose de UV fornecida. Efetuou-se então estimativas de peso molecular de forma mais rigorosa, aumentando-se tanto o número de frações coletadas nos gradientes como o tempo de centrifugação, de modo a se obter um perfil mais nítido de L-DNA. Além disso, a padronização de pesos moleculares foi mais precisa utilizando-se fragmentos de restrição de peso molecular conhecido, conforme indica a figura 8. Nestas novas condições de centrifugação, H-DNA alcança o fundo do tubo, e L-DNA forma perfis mais distintos ao longo do gradiente, independente da dose de UV fornecida (Figura 8A-E). Plotando-se os valores diferenciais de cada fração (DNA tratado com S_1 -endonuclease me-

FIGURA 8. Peso molecular de L-DNA em diferentes fluências de luz UV. Células XPL2RO foram irradiadas com 0 (A,F), 5 (B,G), 10 (C,H), 20 (D,I) e 40 J/m^2 (E,J), incubadas por 45 minutos em meio normal e pulsadas a seguir por mais 45 minutos com $30\mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-Tdr}$. O DNA foi extraído e incubado com (●) ou sem (○) 20U S₁-endonuclease/ml por 30 min a 35°C e centrifugado em gradientes neutros de sacarose por 200 minutos, como descrito em "Métodos e Materiais". Em F-J estão plotados os valores diferenciais de cada fração em A-E, respectivamente $|\% \text{cpm}(\text{DNA tratado com S}_1) - \% \text{cpm}(\text{DNA não tratado})|$. Em F está também indicado o perfil de sedimentação de uma mistura de DNA- ^{32}P de fago λ íntegro e fragmentos de restrição deste DNA após digestão com EcoRI (▼), usados como marcadores para a determinação de peso molecular. Os valores de peso molecular em 10^6 d estão indicados para cada pico. O pico de menor peso molecular é uma mistura dos três fragmentos menores de EcoRI e o peso molecular indicado representa uma média ponderada dos três valores individuais. Sedimentação é da direita para a esquerda. As somatórias dos valores de $\% \text{cpm}$ diferenciais calculadas são: G, 32,4%; H, 38,1%, I, 43,7% e J, 39,2%.

TABELA II

Comparação entre distância interlacunas e distância interdímeros

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>
Dose UV (J/m ²)	Mn (M 1/2) x 10 ⁻⁶ d	Mn (M _w) x 10 ⁻⁶ d	Mn médio x 10 ⁻⁶ d	D. interdímeros (dupla-fita) x 10 ⁻⁶ d	C/D Σ % cpm L-DNA	
5	7,4	7,1	7,3	20,0	0,37	32,4
10	4,3	4,7	4,5	10,0	0,45	38,1
20	2,5	3,2	2,9	5,0	0,58	43,7
40	1,3	2,3	1,8	2,5	0,72	39,2

Os dados das colunas A e B foram obtidos da Figura 8 (F-J), como descrito em "Métodos e Materiais"; dados da coluna C correspondem à média de A e B; os valores da coluna D representam a distância média entre dois dímeros na mesma fita, medida em termos de DNA-dupla-fita, de acordo com a metodologia descrita em "Métodos e Materiais"; na coluna F, estão indicadas as somatórias dos valores individuais de % cpm diferenciais dos perfis de sedimentação descritos na Figura 8 (G-J).

nos DNA não tratado), visualiza-se claramente uma correlação inversa entre a dose de UV fornecida e o peso molecular médio de L-DNA formado (Figura 8,F-J). A partir destes perfis foi possível calcular-se o peso molecular médio de L-DNA e comparar os valores obtidos com as distâncias médias interdímeros esperadas para as diferentes doses de UV utilizadas. A Tabela II indica estes valores obtidos, podendo-se verificar uma correlação bastante aceitável entre a distância interdímeros esperada e o peso molecular de L-DNA formado, para uma mesma dose de UV.

Por outro lado, existe a possibilidade da variação das razões entre o peso molecular de L-DNA e a distância interdímeros (0,37 a 0,72, ver Tabela II) se dever a um erro sistemático na determinação de pesos moleculares de DNA. Isto é plausível porque as duas medidas foram obtidas a partir de procedimentos diferentes de centrifugação e cálculo de peso molecular de DNA. De qualquer modo, nota-se uma visível relação causal entre a distância interdímeros no DNA-molde e o peso molecular médio de L-DNA observado (Tabela II, colunas C e D). Vale notar também que apesar da diminuição gradual do peso molecular de L-DNA formado, a quantidade relativa desta população permanece praticamente constante, como mostra a coluna F da Tabela II.

3.5 Destino de L-DNA

Com o objetivo de verificar a persistência de sítios sensíveis à S_1 -endonuclease em DNA recém-sintetizado após UV, foi efetuado o experimento cujos resultados aparecem na Figura 9. Foram efetuados tempos cres-

% CPM

Nº FRAÇÕES

FIGURA 9. Destino de L-DNA. Células XP12RO foram irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ de luz UV, pulsadas por 45 minutos com $30 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-Tdr}$ e incubadas por crescentes tempos em meio não-radiativo (caça). O DNA foi extraído, tratado com 20 U S_1 -endonuclease/ml por 30 minutos a 35°C e sedimentado em gradientes neutros de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais". Os valores plotados correspondem aos diferenciais de % cpm total dos perfis de sedimentação de DNA tratado ou não tratado com nuclease, na região dos gradientes onde aparecem as novas moléculas produzidas por digestão enzimática. Sedimentação é da direita para a esquerda. Os tempos de caça e % cpm total calculados são: (A) 0 min, 21,4%; (B) 45 min, 23,5%; (C) 90 min, 21,1%; (D) 180 min, 19,4%; (E) 240 min, 17,2%; (F) 360 min, 9,9%.

centes de incubação em meio não radiativo das células irradiadas, após um pulso com precursor marcado, efetuado imediatamente após irradiação com luz UV. O tratamento posterior de DNA com S_1 -endonuclease mostrou um progressivo declínio da quantidade de L-DNA presente, à medida que aumentava o tempo pós irradiação. Este dado é visível na Figura 9, onde foram plotados os valores diferenciais individuais (DNA tratado com enzima menos DNA não tratado), e verifica-se que 6 horas após o pulso, a população de L-DNA é dificilmente detectada. Além disso, o peso molecular médio de L-DNA aparentemente cresce com o tempo, de modo que o perfil tende a deslocar-se gradualmente para a região de H-DNA. Este fenômeno não está porém explicitamente descrito na Figura 9.

4. PERFIL DE BANDEAMENTO DE DNA EM GRADIENTES ISOPÍCNICOS DE CsCl, ANTES OU APÓS TRATAMENTO COM S_1 -ENDONUCLEASE

Experimentos envolvendo marcação de DNA com precursor pesado (BUdr) e posterior bandejamento em gradientes isopícnicos de CsCl, detectam variações de densidade média de DNA, acarretadas pela presença do análogo de Tdr pesado, que vão desde densidade normal (DNA não substituído) até a densidade correspondente a um DNA dito híbrido, neste caso contendo uma fita de densidade normal e a fita complementar sendo totalmente substituída por precursor pesado.

Esta técnica pode fornecer dois tipos de informações:

1. A caracterização, sob condições específicas, de forquilhas de replicação de DNA, as quais apresen

tam uma densidade média intermediária, já que contém DNA replicado e portanto híbrido, ligado a uma porção variável de DNA não-replicado, por sua vez de densidade normal (KATO & STRAUSS, 1974; FUJIWARA & TATSUMI, 1976).

2. A taxa global de progressão das forquilhas de replicação, que pode ser estimada pelo perfil de bandeamento de DNA em gradientes de CsCl (PAINTER & SCHAEFER 1969; CORDEIRO & MENECHINI, 1973).

Dessa forma, é possível com o auxílio desta técnica observar-se a estrutura e a progressão de forquilhas de replicação, após irradiação com luz UV, como mostra a Figura 10. Nesse caso, foi efetuado um pré-pulso antes de UV com BUdr frio, com a finalidade de evitar a associação de DNA recém-sintetizado de densidade normal com DNA híbrido marcado, o qual poderia ser artefactualmente interpretado como DNA próximo da forquilha de replicação.

Assim, após irradiação com 0 ou $12,5\text{J/m}^2$ de luz UV (Figuras 10A e 10B, respectivamente), foram efetuados pulsos com BUdr + H^3Tdr (10:1) final $1.1 \times 10^{-5}\text{M}$). Esta mistura tem praticamente o mesmo efeito que $\text{H}^3\text{-BUdr}$ puro. Os tempos de pulso foram compensados, de modo a se obter uma quantidade de DNA sintetizado após UV, igual à da série não irradiada. Nota-se que os perfis de bandeamento em ambos os casos são equivalentes, se não houver um tratamento prévio com S_1 -endonuclease. Isto indica que a compensação de pulso feita na série irradiada permite obter uma distribuição equivalente de estruturas de replicação de DNA (ver Figu

FIGURA 10. Perfil de bandejamento de DNA pulsado com BUdr em gradientes de densidade. Células XP12RO foram incubadas em meio contendo $10^{-5}M$ BUdr, $10^{-6}M$ FUdr e $10^{-5}M$ de Ur. por uma hora. Após irradiação com 0 (A,C) ou $12,5 J/m^2$ (B) de luz UV, as células foram pulsadas em um meio contendo $10^{-5}M$ BUdr, $10^{-6}M$ FUdr, $10^{-5}M$ Ur e $50 \mu Ci/ml$ 3H -TdR ($10^{-6}M$) por 20 minutos (A) ou 45 minutos (B,C). O DNA foi extraído, incubado com (....) ou sem (—) 60 U S₁-endonuclease/ml por 30 min a 35°C e centrifugado em gradientes neutros de CsCl, como descrito em "Métodos e Materiais". As setas à esquerda e direita correspondem às densidades de DNA híbrido e normal, respectivamente.

ra 10). A situação é porém drasticamente alterada se os DNAs sintetizados após UV são previamente sujeitos a tratamento enzimático. Este procedimento leva a um deslocamento nítido de parte do DNA sintetizado após UV para a posição de DNA híbrido, permanecendo apenas cerca de metade do material na posição referente a DNA intermediário, nestas condições correspondendo a DNA próximo da forquilha de replicação (ver Figura 10B). Já DNA sintetizado a partir de um DNA-molde não irradiado é praticamente refratário à ação de S_1 -endonuclease, ocorrendo apenas um pequeno incremento na população de densidade híbrida (ver Figura 10A).

Por outro lado, a Figura 10C mostra o perfil de bandejamento obtido quando a série-controle é submetida a um pulso equivalente ao da série irradiada (45 minutos). Nestas condições praticamente todo DNA bandeia na região de DNA híbrido, indicando uma progressão efetiva das forquilhas de replicação neste período. O mesmo fenômeno pode ser observado na série irradiada, quando as células foram incubadas, após o pulso, na presença de BUdr frio (resultados não apresentados).

Outro resultado obtido refere-se à caracterização em separado de H-DNA e L-DNA, quanto ao perfil de bandejamento em gradientes isopícnicos de CsCl, conforme mostra a Figura 11. Neste caso foi omitido o pré-pulso com BUdr, e após irradiação com UV seguiu-se um protocolo de marcação em tudo idêntico ao anteriormente descrito.

Porém, após extração e purificação de DNA, este era previamente tratado ou não com S_1 -endonuclease e

submetido a gradientes neutros de sacarose. Em seguida, coletou-se as frações correspondentes a H-DNA (1-15) e L-DNA (16-27), a partir de um perfil de sedimentação em tudo análogo ao descrito na Figura 4B. As frações foram somadas em "pool" e exaustivamente dializadas, sendo então submetidas à ultracentrifugação em gradientes isopícnicos de CsCl.

Devido à ausência de pré-pulso com BUdr, não se nota nestas condições formação significativa de DNA híbrido, quando DNA não é previamente submetido a tratamento enzimático (ver Figura 11A,B). Todavia, após digestão com S₁-endonuclease, o DNA sintetizado após irradiação UV apresentou um perfil de bandeamento com um pico característico na região de DNA híbrido (Figura 11B), enquanto que o perfil do controle não irradiado permanece essencialmente inalterado (Figura 11A).

Por outro lado, as populações de H-DNA e L-DNA, isoladas conforme o procedimento antes descrito, mostraram perfis de bandeamento totalmente distintos em gradientes de CsCl. Nesse caso, a maioria de L-DNA bandeia na posição de DNA híbrido (Figura 11C), enquanto que H-DNA é constituído exclusivamente de DNA de densidade intermediária (Figura 11D).

Uma explicação aceitável para o pequeno pico na região de densidade intermediária, observado para L-DNA, baseia-se na possibilidade de ter havido uma contaminação de L-DNA com DNA de baixo peso molecular previamente existente nesta faixa do perfil de sedimentação, o qual não corresponde necessariamente a L-DNA, aqui definido como DNA de baixo Mn originado por digestão enzimática. Isto é

FIGURA 11. Resolução de L-DNA após bandeamento em gradientes de densidade. Células XP12RO foram irradiadas com 0 (A) ou 12,5 J/m² (B,C,D) de luz UV e incubadas em meio contendo 10⁻⁵M BUdr, 10⁻⁶M FUdr, 10⁻⁵M Ur e 50 µCi/ml de ³H-Tdr (10⁻⁶M) por 20 minutos (A) ou 45 minutos (B,C,D). O DNA foi extraído e incubado com (●) ou sem (○) 60U S₁-endonuclease/ml por 30 minutos a 35°C. Em A e B, o DNA foi diretamente centrifugado em gradientes neutros de CsCl. Em C e D o DNA foi previamente sedimentado em gradientes neutros de sacarose, e as frações correspondendo a L-DNA (C) e H-DNA (D) (conforme a Figura 4B) foram acumuladas, dializadas e centrifugadas em gradientes neutros de CsCl, conforme descrito em "Métodos e Materiais". As setas à esquerda e direita correspondem às densidades de DNA híbrido e normal, respectivamente.

plausível, uma vez que pode-se verificar uma quantidade significativa de DNA na região de L-DNA, mesmo antes de tratamento enzimático (ver Figura 4).

5. SÍTIOS SENSÍVEIS À S_1 -ENDONUCLEASE EM DNA SINTETIZADO APÓS UV, EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

5.1 Culturas com ciclo celular sincronizado

Um dado anterior de literatura (COLLINS, 1977) indicou a ocorrência de regiões de DNA simples-fita em genomas de células humanas WI-38, não tendo neste caso sido submetidas a qualquer injúria. Nesse caso, a estimativa da quantidade de regiões simples-fita de DNA foi efetuada através de sensibilidade do DNA à ação de S_1 -endonuclease e perfil de bandejamento em gradientes de $CsSO_4/AgClO_4$. De qualquer forma, o conteúdo genômico de DNA simples-fita apresentou uma significativa variação durante as fases do ciclo celular, observando-se um conteúdo máximo de DNA simples-fita enquanto as células estavam na metade da fase S (COLLINS, 1977).

Considerou-se então oportuno verificar se DNA sintetizado após UV em culturas sincronizadas exibia o mesmo padrão de comportamento, no que se refere ao perfil de sedimentação após tratamento com S_1 -endonuclease. A sincronização das células, neste caso da linhagem 3T3, foi efetuada por carenciamento de soro do meio de cultivo, e posterior restímulos de proliferação através de readiação de meio rico em soro, conforme descrito em "Métodos e Materiais".

FIGURA 12. Ação de S_1 -endonuclease sobre DNA nascente dupla-fita de células em crescimento exponencial ou com ciclo celular sincronizado. Células 3T3 foram mantidas em crescimento exponencial (A,B) ou sincronizadas (C,D) como descrito em "Métodos e Materiais". A seguir, as culturas foram irradiadas com 0 (A,C) ou $12,5 \text{ J/m}^2$ (B,D) de luz UV. Incubou-se por 30 minutos em meio normal, seguindo-se um pulso de 30 minutos com $30 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-Tdr}$. O DNA foi extraído e tratado com 0 (●) ou $20 \text{ U } S_1\text{-endonuclease/ml}$ (○) por 30 minutos a 35°C , e então centrifugado em gradientes neutros de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação e da direita para a esquerda.

Assim, a Figura 12 mostra os resultados obtidos de acôrdo com este procedimento. Verifica-se que os perfís de sedimentação de DNA obtidos após tratamento enzimático, foram análogos tanto no caso de culturas em crescimento exponencial quanto em culturas com ciclo celular sincronizado, observando-se em ambos casos um nítido caráter bimodal do perfil de sedimentação de DNA sintetizado após UV, quando tratado com S_1 -endonuclease (ver Figura 12).

5.2 Efeito da presença de cafeína no meio de cultura.

Correlação com o peso molecular de DNA sintetizado após UV

Neste caso, também foram utilizadas células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongo). É sabido que células de roedores possuem um sistema de reparo-excisão de dímeros de pirimidina bastante deficiente (TROSKO & col., 1965) e analogamente às células XP12RO, não existe remoção substancial de lesões de DNA-molde durante um tempo bastante extenso após UV. Porém, ao contrário de células XP12RO, linhagens de roedor exibem uma taxa de sobrevivência frente à UV equivalente a células humanas proeficientes em reparo-excisão, devido a um sistema de RPR bastante atuante (LEHMANN, 1972, MEYN & HUMPHREY, 1971).

Todavia, o RPR de células de roedor é sensível à presença de cafeína ou teofilina no meio de cultura, nestas condições ocorrendo uma inibição de alongação de DNA recém-sintetizado após UV (LEHMANN & KIRK-BELL, 1974). Contudo, esta inibição é observada apenas no caso de células

FIGURA 13. Ação de S_1 -endonuclease sobre DNA recém-sintetizado na presença de cafeína. Células 3T3 foram irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ de luz UV, incubadas por 30 minutos em meio contendo cafeína nas concentrações indicadas, pulsadas com $30 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-Tdr}$ por mais 30 minutos em meio nas mesmas condições, e então incubadas em meio não radiativo contendo ou não cafeína (caça). Após os tempos de caça indicados, DNA foi extraído, tratado com O (---) ou 20 U S_1 -endonuclease/ml (.....) por 30 minutos a 35°C e centrifugado em gradientes neutros de sacarose, conforme descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda. Os números entre parenteses indicam o M_n em 10^6 do mesmo DNA, determinado a partir de gradientes alcalinos de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais".

préviamente irradiadas, já que em células não tratadas a cafeína não altera a progressão da forquilha de replicação (DONIGER, 1978), nem diminui o peso molecular de DNA recém-sintetizado (TROSKO & CHU, 1973). Por outro lado, deve ser salientado que um trabalho mais recente apresenta evidências de que cafeína em certas condições estimula a iniciação de novos replicons, mesmo em células não irradiadas (TATSUMI & STRAUSS, 1979).

De posse destes dados, testou-se a hipótese de haver uma correlação entre a inibição da elongação de cadeia antes observada, no caso correspondendo à inibição de RPR, e a frequência de sítios sensíveis à S_1 -endonuclease, em DNA replicado após UV.

A Figura 13 mostra os resultados obtidos quando células 3T3 foram incubadas por tempos crescentes na presença de cafeína 5 mM, após irradiação com luz UV. Quanto à presença de sítios sensíveis à S_1 -endonuclease, verifica-se que a presença da droga acarreta um acúmulo de L-DNA, impedindo que este desapareça mesmo após 6 horas de caça. Este tempo todavia é suficiente para que em condições normais o DNA sintetizado já esteja praticamente refratário ao tratamento enzimático (ver Figura 13). De qualquer modo, mesmo na presença de cafeína ocorre um nítido deslocamento de L-DNA para a região de alto peso molecular, com o decorrer do tempo após UV. Outro fenômeno observado relaciona-se com o peso molecular inicial e a taxa de elongação de DNA sintetizado após UV, na presença de cafeína. Assim, culturas irradiadas e incubadas na presença de cafeína apresentam um DNA nascente menor e com uma taxa de crescimento inibida, con-

forme mostram os valores de peso molecular médio de DNA obtidos nestas condições, indicados na figura 13. Por outro lado, culturas não expostas a UV e incubadas na presença de cafeína nas mesmas condições não apresentaram qualquer alteração no que se refere à presença de sítios sensíveis a S_1 -endonuclease e taxa de elongação de DNA, quando comparadas a culturas incubadas em meio normal (resultados não apresentados).

5.3 Diferentes linhagens celulares

Sabe-se que o ciclo celular, a duração de fase S, a velocidade média de replicação de DNA, a resistência à luz UV, assim como outros parâmetros biológicos, variam consideravelmente entre diferentes linhagens celulares. Devido a isso, procurou-se verificar se o comportamento característico de DNA sintetizado após UV e tratado com S_1 -endonuclease se manteria entre diversas linhagens de células, submetidas a um mesmo tratamento com UV e nuclease. Foram testadas seis linhagens diferentes, como indicado na Figura 14. Nota-se que o caráter bimodal do perfil de sedimentação de DNA foi mantido para todas as linhagens, não obstante existirem diferenças significativas entre estes, sob vários aspectos. Assim, por exemplo, XP12RO, linhagem extremamente sensível à luz UV, totalmente deficiente para reparo-excisão de dímeros de pirimidina, forneceu um resultado análogo à VA13, por sua vez proficiente em reparo-excisão, e portanto muito mais resistente a UV (ver Figura 14). Por outro lado, a necessidade da presença e o próprio efeito de

FIGURA 14. Ação de S_1 -endonuclease sobre DNA nascente duplamente marcada de diferentes linhagens irradiadas com UV. Culturas das linhagens indicadas foram irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ de luz UV, incubadas por 30 minutos em meio contendo O (XP12RO, VA-13, BHK) ou 2 mM de cafeína (CHO, 3T3, Y-1), e pulsadas por 45 minutos com $30 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-Tdr}$, além de cafeína nas mesmas condições. DNA foi extraído, tratado com O (—) ou 20U S_1 -endonuclease/ml (....) e centrifugado em gradientes neutros de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda.

cafeína também variou entre as quatro linhagens de roedores testadas, todas elas com um baixo nível de reparo-excisão. Assim, BHK, mesmo na ausência de cafeína exibiu um perfil nitidamente bimodal, enquanto que CHO, 3T3 e Y-1 apresentaram respectivamente uma gradual diminuição de sensibilidade a S_1 -endonuclease, mesmo em presença da xantina metilada, (ver Figura 14).

Foi possível constatar que o perfil bimodal observado inicialmente para XP12RO não se tratava de um fenômeno circunscrito às condições experimentais utilizadas ou decorrente de propriedades fisiológicas particulares, inerentes àquela linhagem.

6. SÍTIOS SENSÍVEIS À S_1 -ENDONUCLEASE EM DNA SINTETIZADO APÓS UV, PRÓXIMO OU AFASTADO DA FORQUILHA DE REPLICAÇÃO

Com o intuito de verificar se regiões de DNA replicado após UV já afastadas porém da forquilha de replicação, continham sítios sensíveis a S_1 -endonuclease, foi elaborado o experimento cujos resultados aparecem na figura 15. Assim, DNA marcado com precursor pesado (BUdr) após irradiação UV, foi submetido a bandejamento em gradientes isopícnicos de CsCl e as frações correspondentes a DNA híbrido e de densidade intermediária agrupadas separadamente, como descrito em "Métodos e Materiais". Devido às condições experimentais utilizadas, o DNA híbrido marcado corresponde forçosamente a DNA sintetizado após UV, já distante todavia da forquilha de replicação, enquanto que DNA

FIGURA 15. Ação de S_1 -endonuclease sobre DNA replicado após UV. Células CHO foram incubadas por uma hora em meio contendo $10^{-5}M$ BUdr, $10^{-6}M$ FUdr, $10^{-5}M$ Ur e a seguir irradiadas com 0 (A,B,C) ou $12,5 J/m^2$ (D,E,F) de luz UV. Efetuou-se então um pulso em meio contendo $10^{-5}M$ BUdr, $10^{-6}M$ FUdr, $10^{-5}M$ Ur e $50 \mu Ci/ml$ de 3H -Tdr ($10^{-6}M$), por 30 minutos (A,B,C) ou 1 hora (D,E,F). O DNA foi extraído e submetido (B,C,E,F) ou não (A,D) à centrifugação em gradientes isopícnicos de CsCl. As frações correspondendo a DNA replicado após UV afastado da forquilha de replicação (B,E, DNA híbrido) e DNA replicado após UV próximo da forquilha de replicação (C,F, DNA intermediário, ver texto), foram acumuladas e exaustivamente dializadas. Os DNA's foram então tratados (...) ou não (—) com 20 U S_1 -endonuclease/ml por 30 minutos a $35^\circ C$, e centrifugados em gradientes neutros de sacarose, conforme descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda.

de densidade intermediária corresponde ao DNA presente nas cercanias da forquilha de replicação.

Verifica-se que tanto o DNA híbrido como o de densidade intermediária apresentaram sítios sensíveis à S_1 -endonuclease, quando da irradiação prévia das células com luz UV, ao passo que os controles não irradiados mostraram-se muito mais refratários ao tratamento enzimático, em quaisquer condições (ver Figura 15). Além disso, foi visto também que a presença de cafeína no meio de cultura após UV acarreta um aumento do número de sítios sensíveis a S_1 -endonuclease, principalmente no caso de DNA híbrido (resultados não apresentados).

Outra importante informação obtida é a de que o caráter bimodal do perfil de sedimentação após tratamento enzimático deve-se essencialmente a uma estrutura particular do DNA replicado na região de progressão da forquilha (DNA de densidade intermediária, ver Figura 15), a qual contém a maior parte dos sítios sensíveis a S_1 -endonuclease.

7. SENSIBILIDADE DE DNA SIMPLES-FITA AO TRATAMENTO COM

S_1 -ENDONUCLEASE

7.1 Efeito de concentrações crescentes de S_1 -endonuclease

No sentido de se obter uma estimativa da frequência de clivagens introduzidas numa certa extensão de DNA simples-fita (denaturado), para uma dada concentração de S_1 -endonuclease, foi efetuado o experimento cujos resulta

FIGURA 16. Frequência de quebras em DNA simples-fita, em função da concentração de S₁-endonuclease. Células XP12RO foram marcadas por 24 horas com 1 μ Ci/ml de ³H-Tdr, o DNA extraído e denaturado pela adição de NaOH 1N para concentração final igual a 0,1N. Após incubação por 10 minutos a 25°C, o pH foi ajustado para 7,4 pela adição de HCl 1N. Este DNA (4,4 μ g/ml) foi então submetido à digestão com as concentrações indicadas de S₁-endonuclease, por 30 minutos a 35°C, os DNA's centrifugados por 240 minutos em gradientes alcalinos de sacarose e a frequência de clivagens estimada como descrito em "Métodos e Materiais".

dos aparecem na Figura 16. Nesse caso, as concentrações de enzima empregadas foram muito mais baixas que aquelas utilizadas nos experimentos envolvendo DNA dupla-fita sintetizado após UV. Isto porque a metodologia empregada para a avaliação do número de quebras enzimáticas introduzidas nas cadeias de DNA denaturado (centrifugação em gradientes alcalinos de sacarose) é mais sensível nesta faixa de frequência de quebras em DNA.

Foi possível verificar que o número de clivagens introduzidas em DNA aumenta linearmente com a concentração de enzima empregada. Isto significa que a atividade específica da enzima ($\text{clivagens} \cdot \text{dalton}^{-1} \cdot U_{S_1}^{-1}$), (K), pode ser calculada diretamente a partir da inclinação da reta obtida (ver Figura 16). Assim, o valor médio de K, obtido a partir de 3 experimentos análogos ao descrito na figura 16 foi determinado como sendo igual a $1,75 \times 10^{-6}$ clivagens. $\text{dalton}^{-1} \cdot U_{S_1}^{-1}$.

7.2 Efeito de concentrações crescentes de DNA simples-fita

Um procedimento experimental análogo ao anteriormente descrito foi utilizado para se avaliar a influência da concentração de DNA simples-fita na produção de clivagens por S_1 -endonuclease. Nesse caso, a atividade de enzima foi mantida constante (0,11 U/ml, ver Tabela III), assim como a concentração de DNA simples-fita marcado. Porém, foram adicionadas quantidades crescentes de DNA denaturado frio, verificando-se, em cada caso, a frequência de cliva-

TABELA III

Atividade de S_1 -endonuclease sobre crescentes concentrações
de DNA denaturado

Concentração de DNA ($\mu\text{g/ml}$)	Quebras / 10^8 daltons
2,0	42
18,6	54
35,2	54
68,4	60

O procedimento experimental foi análogo ao descrito na Figura 16, exceto que a concentração de DNA variou como indicado, e a concentração de S_1 -endonuclease permaneceu constante, a 0,11U/ml.

gens introduzida pela nuclease. Esta frequência permaneceu .
todavia constante, independente da adição de um grande exces-
so de DNA denaturado frio (ver Tabela III). Isto implica que
K é largamente independente da concentração de DNA simples-
fita presente, pelo menos nas condições aqui utilizadas.

8. SENSIBILIDADE DE DNA REPLICADO APÓS UV A CRESCENTES CONCENTRAÇÕES DE S_1 -ENDONUCLEASE

Diferentes experimentos descritos anteriormente mostraram que DNA sintetizado após UV exibe um per-
fil bimodal de sedimentação, quando tratado com S_1 -endonucleaa
se, aparecendo uma população de DNA de baixo peso molecular
(L-DNA). Todavia, na maior parte dos casos empregou-se a en-
zima numa única concentração (20 U/ml), obtendo-se nestas con-
dições uma equiparidade entre as populações de H-DNA e L-DNA.

Visando determinar a influência da con-
centração de S_1 -endonuclease na quantidade relativa de L-DNA
gerado após tratamento enzimático, foram efetuados os experi-
mentos cujos resultados aparecem nas Figuras 17 e 18. Quando
DNA sintetizado após UV é tratado com crescentes concentra-
ções de enzima, porém menores que as usualmente utilizadas, ve-
rifica-se um gradual incremento da população de L-DNA, como
ilustra a Figura 17. Assim, o perfil de sedimentação corres-
pondente a esta população torna-se cada vez mais nítido, ter-
minando por equivaler quantitativamente à população de H-DNA,
a qual permanece por sua vez refratária ao tratamento nucleo-
lítico (ver Figura 17).

FIGURA 17. Efeito de S_1 -endonuclease na formação de L-DNA. Células XP12RO foram irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ de luz UV, incubadas em meio normal por 30 min e pulsadas por mais 30 min com $30 \mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-Tdr}$. O DNA foi extraído, incubado com 0 (A), 0,5 (B), 1,0 (C), 3,0 (D), 9,0 (E) e 52,5 U/ml (F) de S_1 -endonuclease, por 30 min a 35°C e em seguida centrifugado em gradientes neutros de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda.

PERCENTUAL DE L-DNA FORMADO

FIGURA 18. Cinética de formação de L-DNA em função da concentração de S_1 -endonuclease. Os pontos foram obtidos a partir de diversos experimentos análogos ao descrito na Fig. 17. As somatórias de % cpm to tal correspondendo a L-DNA (frações 17-24) foram tomadas, subtraindo-se o valor basal obtido na ausência de enzima. O valor resultante, correspondendo à digestão com uma alta concentração de S_1 -endonuclease (52,5 U/ml), foi tomado como 100% de L-DNA formado (a máxima quantidade obtível a partir de H-DNA, ver texto o qual foi usado para calcular o percentual de L-DNA para outras concentrações de enzima. Cada ponto representa a média de 2 ou mais determinações.

Uma outra forma de representar este fenômeno baseia-se no cômputo da somatória dos valores diferenciais individuais (DNA tratado com enzima - DNA não tratado) dos perfis de sedimentação, como descrito na Figura 18. Nesse caso, foram considerados os valores das frações 17 até 24, correspondendo à região onde sedimenta L-DNA. Assim, um conjunto de dois ou mais experimentos permitiu obter uma cinética de formação de L-DNA a partir de crescentes concentrações de enzima, conforme mostra a Figura 18. Os valores percentuais de L-DNA gerado referem-se ao valor obtido quando DNA sintetizado após UV foi tratado com 52,5 U/ml, condição esta onde a cinética aparentemente atinge um platô (ver Figura 18), havendo um máximo de L-DNA gerado.

Portanto, a quantidade de L-DNA gerado é dependente da quantidade de S_1 -endonuclease presente, apenas numa determinada faixa de concentração, acima da qual não se obtém qualquer incremento da população de L-DNA.

9. SÍTIOS SENSÍVEIS À S_1 -ENDONUCLEASE EM DNA SINTETIZADO APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO UV

9.1 DNA sintetizado longo tempo após UV ou após doses fracionadas de UV

Os experimentos anteriormente descritos envolvendo S_1 -endonuclease, referiam-se invariavelmente a DNA sintetizado curto tempo (0-90 minutos) após a irradiação com uma única dose de UV. Para testar a possibilidade de DNA sintetizado longo tempo ou após doses fracionadas de UV apresentar uma variação de sensibilidade à S_1 -endonuclease

FIGURA 19. Ação de S₁-endonuclease sobre DNA sintetizado após diferentes tratamentos com luz UV. Células V-79 foram irradiadas com as doses indicadas de UV (UV₁) e, após um intervalo de 10 horas, novamente irradiadas (UV₂), conforme indicado. A seguir, as culturas foram incubadas por 30 minutos em meio contendo ou não cafeína, como descrito, e então pulsadas por 1 hora com 30 μ Ci/ml de ³H-Tdr, além de cafeína nas mesmas condições. O DNA foi extraído, tratado (....) ou não (—) com 20 U S₁-endonuclease/ml por 30 minutos a 35°C, e centrifugado em gradientes neutros de sacarose, conforme descrito em "Métodos e Materiais". Sedimentação é da direita para a esquerda.

se, foram efetuados os experimentos descritos nas Figuras 19 e 20. Nesse caso, células V-79 foram expostas a diferentes condições de irradiação UV, como indicado, sendo então incubadas na presença ou ausência de cafeína 2 mM. O DNA replicado nestas condições foi a seguir tratado com S_1 -endonuclease, analisando-se então os perfis de sedimentação de DNA em gradientes neutros de sacarose, de forma idêntica aos procedimentos antes descritos.

Verifica-se que DNA sintetizado longo tempo após UV, assim como após doses parceladas, é bem mais refratário à ação de S_1 -endonuclease, se comparado com DNA recém-sintetizado logo após a introdução das lesões. Este fenômeno torna-se mais evidente quando as culturas são incubadas na presença de cafeína, durante o pulso com timidina tritiada, obtendo-se uma visível alteração dos perfis de sedimentação na região de L-DNA (ver Figura 19). Por outro lado, na Figura 20 estão descritos os resultados obtidos a partir de um experimento análogo. Desta feita porém estão representados os valores percentuais de L-DNA ($< 10^7$ daltons) obtidos após digestão enzimática, descontada a atividade da enzima observada no controle não irradiado, e normalizados com respeito ao máximo valor assim obtido (valor absoluto igual a 20%).

De qualquer modo, os resultados mais uma vez indicam que DNA sintetizado longo tempo ou após doses fracionadas de UV é visivelmente mais refratário ao tratamento enzimático (ver Figura 20).

9.2 Comparação entre o peso molecular de DNA recém-sintetizado e a frequência de dímeros no DNA-molde

Concomitantemente com a diminuição de sítios sensíveis a S_1 -endonuclease em DNA recém-sintetizado nas condições antes descritas, ocorre um aumento nítido do peso molecular desse DNA, se comparado com a distância interdímeros no DNA-molde. Neste caso, a distância interdímeros foi obtida através de clivagem do DNA-molde contendo dímeros com UV-endonuclease, conforme descrito em "Métodos e Materiais". Assim foi possível comparar diretamente o peso molecular médio de DNA recém-sintetizado (marcado com ^3H -Tdr e a distância média interdímeros (DNA-molde marcado com ^{14}C -Tdr e tratado com UV-endonuclease), conforme mostra a Figura 20.

Nota-se claramente que DNA sintetizado longo tempo após UV, assim como após doses fracionadas, exibe um menor percentual de L-DNA gerado por incubação com S_1 -endonuclease. Além disso, este fenômeno é acompanhado pela obtenção, nas mesmas condições de irradiação UV, de um DNA recém-sintetizado visivelmente maior que a distância média interdímeros (ver Figura 20).

Por outro lado, a expressão de ambos fenômenos parece ser dependente do tempo de intervalo entre duas doses de UV, uma vez que um intervalo de 8 horas entre duas doses propicia resultados bem mais drásticos que os obtidos quando o intervalo é de apenas 2 horas (ver Figura 20).

FIGURA 20. Peso molecular e conteúdo de lacunas de DNA replicado após diferentes tratamentos com luz UV. Cêls.V-79 foram incubadas por 15 h em meio contendo 0,15µCi/ml de ¹⁴C-Tdr e então submetidas aos tratamentos com UV indicados. Após UV₂, incubou-se as culturas em meio normal por 30 min e pulsou-se por mais 30 min com 20µCi/ml ³H-Tdr. O DNA foi extraído e submetido a um dos 2 tratamentos alternativos: em A, o DNA foi tratado com UV-endonuclease e submetido à centrifugação em gradientes alcalinos de sacarose, como descrito em "Métodos e Materiais". Estão indicados os perfis de sedimentação de DNA-³H(—) recém-sintetizado após UV, e DNA-¹⁴C (---), correspondendo, após digestão enzimática, à distância média interdímeros (ver texto). Em B, o DNA foi tratado com 0 ou 30U S₁-endonuclease/ml por 30min a 35°C e centrifugado em gradientes neutros de sacarose, como detalhado em "Métodos e Materiais". Os valores indicados referem-se aos percentuais de L-DNA (<10⁷ d) obtidos após digestão enzimática, descontada a atividade da enzima observada no controle não irradiado, e normalizados com respeito ao máximo valor assim obtido (~20%). Sedimentação é da direita para a esquerda.

IV. DISCUSSÃO

1. EFEITO DE IRRADIAÇÃO UV SOBRE A TAXA DE SÍNTESE E DE ELONGAÇÃO DE DNA

Quando células XP12RO foram submetidas à irradiação com luz UV, observou-se nítidas variações do status da replicação de DNA, ocorrendo uma inibição da taxa global de síntese (Figura 1), a formação de DNA nascente de menor peso molecular (Figura 2), DNA este que apresenta uma elongação deficiente (Figura 3). A razão de se trabalhar com esta linhagem prende-se ao fato desta apresentar uma severa deficiência de reparo-excisão de dímeros de pirimidina, podendo-se assim atribuir toda incorporação de precursor marcado à própria síntese semiconservativa de DNA. A explicação mais plausível para esse conjunto de fenômenos é aquela baseada no modelo bacteriano (RUPP e col., 1971), isto é, a progressão das forquilhas de replicação é afetada pela ocorrência de dímeros de pirimidina no DNA-molde. Assim, a replicação progride até um ponto onde ocorre um dímero, sendo então bloqueada temporariamente. Eventualmente, ocorre a retomada de síntese num ponto além da lesão, conseqüentemente acarretando a formação de lacunas no DNA recém-sintetizado, numa região oposta ao dímero. Em bactérias, um processo de recombinação é o responsável pelo preenchimento das lacunas (RUPP e col., 1971), enquanto que em eucariotos este mecanismo parece ser pouco atuante (MENECHINI & MENCK, 1978), provavelmente ocorrendo síntese de novo para o preenchimento das lacunas (LEHMANN, 1972).

A interpretação inicial de lacunas (LEHMANN 1972), é uma hipótese consistente com o quadro de resultados observados, não sendo todavia, uma explicação única. Assim, EDENBERG (1976) argumenta que o baixo peso molecular de DNA sintetizado após UV poderia ser devido ao acúmulo de replicons recém-iniciados, neste caso os dímeros se constituindo em bloqueios efetivos de replicação e não ocorrendo a formação de lacunas no DNA recém-sintetizado. Além disso, foi também proposto um modelo conciliatório (MENEIGHINI, 1976), onde os dímeros presentes no DNA molde só dariam origem a lacunas no DNA replicado de forma descontínua ($3' \rightarrow 5'$), enquanto que replicação contínua ($5' \rightarrow 3'$) seria bloqueada temporariamente pela presença da lesão no DNA-molde.

Estas três alternativas estão esquematizadas na Figura 21. Verifica-se que uma mesma distribuição de dímeros no DNA parental leva a situações totalmente distintas, no que se refere à topografia de replicons atuantes nesta região. Assim, em A aparece a configuração de DNA recém-sintetizado resultante da formação de lacunas opostas a todos os dímeros encontrados pela maquinaria de replicação, como proposto por LEHMANN (1972). Já em B, os dímeros presentes bloqueiam efetivamente a progressão dos replicons acarretando um acúmulo de replicons recém iniciados, neste caso não ocorrendo a formação de lacunas (EDENBERG, 1976). Um mecanismo conciliatório, como proposto inicialmente por MENEIGHINI (1976), está representado em C. Neste caso, a síntese contínua ($5' \rightarrow 3'$) é temporariamente bloqueada pela presença de um dímero na cadeia parental, enquanto que a síntese descontínua ($3' \rightarrow 5'$) propicia a formação de lacunas opostas à dímeros.

FIGURA 21. Modelos alternativos de síntese de DNA a partir de molde lesado, em células de eucariotos. Estão esquematizados três modelos alternativos que explicam a presença de DNA recém-sintetizado (—) de baixo peso molecular em células irradiadas. Neste caso o DNA-molde contendo dímeros (▲). Em A, a explicação é a de formação de lacunas opostas a dímeros, como proposto inicialmente por LEHMANN (1972). Em B, haveria um acúmulo de replicons recém-iniciados, devido a um bloqueio efetivo acarretado pela presença de dímeros (EDENBERG, 1976). Em C, está descrito um modelo conciliatório, onde lacunas seriam formadas apenas em DNA sintetizado de forma descontínua, enquanto que síntese contínua seria bloqueada temporariamente pelos dímeros (MENECHINI, 1976; CORDEIRO-STONE e col., 1979). As setas indicam hipotéticos sítios de ação de S_1 -endonuclease.

De qualquer modo, deve ser ressaltado que qualquer dos três mecanismos de síntese a partir de DNA molde lesado descritos pode explicar o baixo peso molecular de DNA nascente observado após UV, assim como a inibição de taxa global de síntese de DNA obtida.

2. PRESENÇA DE LACUNAS EM DNA SINTETIZADO APÓS IRRADIAÇÃO UV

A interpretação de lacunas em DNA recém-sintetizado após UV em células de eucariotos baseou-se inicialmente na análise dos perfis de sedimentação em gradientes alcalinos de sacarose, de DNA replicado após UV (LEHMANN, 1972). Um resultado típico deste tipo de abordagem é mostrado na Figura 2. Nota-se que o DNA recém-sintetizado após UV é menor em relação a controles não irradiados, mesmo se o pulso com precursor marcado é compensado, de forma a se obter quantidades equivalentes de DNA replicado em ambos os casos (15 minutos e 45 minutos, ver Figura 2). Este procedimento assegura que os fenômenos observados quanto à inibição de síntese de DNA não sejam devidos a uma diminuição de velocidade instantânea de polimerização de DNA, acarretada pela irradiação com luz UV. Além disso, o fato de DNA recém-sintetizado após UV persistir menor que os controles nestas condições, com um peso molecular médio análogo à distância interdímeros no DNA molde esperada para a dose de UV fornecida, sugere que ocorrem descontinuidades físicas neste DNA replicado, em regiões opostas aos dímeros.

Por outro lado, esta abordagem experimental não permite excluir a hipótese de estarem ocorrendo blo

queios efetivos de replicação quando a forquilha do repli-con atinge um dímero, da forma esquematizada na Figura 21B, e de acordo com a proposição de EDENBERG (1976).

Uma metodologia alternativa para a detecção direta de lacunas em DNA foi posteriormente introduzida por MENECHINI (1976). Neste caso, DNA replicado após UV foi digerido com uma endonuclease de Neurospora crassa, específica para DNA simples-fita. Assim, as hipotéticas lacunas constituiriam sítios de ataque enzimático, e a clivagem nucleolítica neste ponto resultaria na produção de duplas-quebras na fita de DNA. Consequentemente ocorreria uma diminuição do peso molecular médio de DNA, passível de ser detectada em gradientes neutros de sacarose. Isto foi de fato observado, evidenciando-se uma sensibilidade ao tratamento enzimático muito maior no caso de DNA replicado após UV, quando comparado com controles não irradiados (MENECHINI, 1976).

O enfoque experimental usado aqui para a detecção de lacunas manteve-se essencialmente o mesmo, apenas utilizando S_1 -endonuclease de Aspergillus oryzae, outra enzima que digere especificamente DNA simples-fita. A Figura 4 mostra um resultado experimental obtido nestas condições. Nota-se que DNA replicado após UV é sensível à digestão nucleolítica, obtendo-se nesse caso um perfil de sedimentação de DNA francamente bimodal, contendo uma população de DNA de baixo peso molecular (L-DNA) e outra de peso molecular bem mais elevado (H-DNA, ver Figura 4). Por outro lado, a hipótese dos dímeros per si constituírem sítios de ação enzimática pode ser descartada, uma vez que o controle irradiado ao término do pulso com precursor marcado (Figura

4A) ser praticamente refratário à S_1 -endonuclease. Este fenômeno se mantém, não obstante uma ampla variação tanto de atividade enzimática como do tempo de digestão de DNA, como mostra a Tabela I. Além disso, o caráter bimodal do DNA replicado após UV torna-se cada vez mais evidente à medida que aumenta a dose de UV fornecida, em correlação com a diminuição do peso molecular médio de DNA (ver Figura 5), indicando que tanto a sensibilidade do DNA à S_1 endonuclease como a capacidade de elongação desse mesmo DNA são dependentes de frequência de dímeros no DNA-molde. Estes resultados sugerem fortemente a ocorrência de lacunas opostas a dímeros em DNA sintetizado após UV.

Todavia, uma questão que ocorre neste ponto é a razão pela qual grande parte do DNA permanece refratário à enzima, não contendo portanto lacunas. Uma vez que a distribuição de dímeros no DNA molde, após irradiação UV, é sabidamente aleatória e essencialmente homogênea ao longo de todo genoma, seria esperado que a totalidade do DNA replicado após UV contivesse lacunas. Uma possível explicação para este resultado é a de que uma parte dos replicons atuantes após UV e portanto marcados durante o pulso, não alcançam nenhum dímero presente na cadeia-molde. Isto é viável no caso de replicons já maduros sofrendo um processo de junção com replicons adjacentes, bem como no caso de haver um hipotético "desligamento" de replicons ativos, acarretada pela irradiação UV, como sugerido por DONIGER (1978).

Uma maneira de testar ambas hipóteses é efetuar-se o pulso com precursor marcado apenas um certo tempo após a exposição à luz UV, tempo este suficiente para que

todos os replicons ativos alcancem dímeros na cadeia-molde, bem como para que ocorra o "desligamento" de replicons antes mencionado. Os resultados obtidos de acordo com esse enfoque aparecem na figura 6. Verifica-se que os perfis bimodais de sedimentação de DNA após tratamento enzimático, permanecem essencialmente os mesmos, com ou sem pré-pulso após a irradiação UV. Contudo, a distribuição de radioatividade entre as populações de H-DNA e L-DNA torna-se equitativa, quando o pré-pulso é efetuado (ver Figura 6). Além disso, esta propriedade se mantém mesmo quando as doses de UV são aumentadas para até 50 J/m^2 , nestas condições sendo virtualmente impossível um dado replicon não alcançar nenhum dímero, durante o período de marcação (ver Figura 7).

Estes dados experimentais confirmam a existência de lacunas em DNA recém-sintetizados após irradiação UV, ocorrendo além do mais uma forte relação causal entre lacunas e dímeros presentes no DNA-molde. Por outro lado, respostas ao tratamento enzimático idênticas foram observadas em diferentes linhagens celulares (Figura 14) ou mesmo em condições alternativas de proliferação celular (Figura 12).

Todavia, estas lacunas desaparecem gradualmente com o passar do tempo após UV (Figura 9), possivelmente por preenchimento destas através de síntese de novo (LEHMANN, 1972). Contudo, este preenchimento das supostas lacunas pode ser inibido pela presença de cafeína (CLEAVER & THOMAS, 1969) no caso de células de roedores, as quais apresentam um RPR sensível a esta droga, ocorrendo u-

ma inibição da elongação de DNA sintetizado após UV (LEHMANN, & KIRK-BELL, 1974). Assim, a hipótese da presença de lacuna ser responsável, ao menos em parte, pelo baixo peso molecular de DNA sintetizado após UV, pôde ser confirmada uma vez que cafeína inibe visivelmente o processo de desaparecimento de lacunas, isto ocorrendo de forma concomitante com uma menor elongação do DNA replicado após UV (ver Figura 13).

3. UM MODELO DE REPLICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE MOLDE LESADO

Como anteriormente salientado no item "Resultados" desta tese, é possível, em determinadas condições, analisar a distribuição de estruturas ativas de replicação de DNA. Isto é feito através de gradientes isopícnicos de CsCl, neste caso o DNA contendo um análogo pesado de timidina (BUdr). Um dos resultados obtidos de acordo com esta metodologia aparece na Figura 10. Verifica-se que no caso de irradiação prévia com UV é necessário um tempo mais longo para se obter a mesma distribuição de estruturas de replicação ao longo do perfil de bandamento, observada nos controles não irradiados. Isto indica que a progressão das forquilhas de replicação de DNA é inibida após irradiação UV, presumivelmente devido à presença de dímeros no DNA-molde.

Por outro lado, o tratamento prévio do DNA replicado com S₁-endonuclease não produz efeito significativo nos controles não irradiados, enquanto que DNA replicado após UV exibe uma alteração visível de perfil de

bandeamento, nas mesmas condições. Isto ocorre notadamente na região de densidade intermediária, onde cêrca de metade da quantidade de DNA anteriormente presente é deslocada para a região de DNA híbrido, após tratamento enzimático (ver Figura 10). Uma vez que nestas condições de ensaio o DNA de densidade intermediária corresponde ao DNA presente nas cercanias da forquilha de replicação, os resultados anteriores indicam que esta é a porção do DNA replicado que sofre alterações estruturais e dinâmicas quando da replicação a partir de um DNA-molde contendo dímeros.

A hipótese da forquilha de replicação não ter uma progressão normal após irradiação UV também é sugerida pelas curvas de inibição de síntese de DNA obtidas quando células são irradiadas com 5 e 12,5 J/m² (ver Figura 1). Os tempos observados para se obter um platô de inibição (35 e 15 minutos, respectivamente) são compatíveis com os tempos necessários para a maquinaria de replicação percorrer a distância média interdímeros esperada para cada dose de UV. Assim, a forma das curvas cinéticas poderia refletir pausas sucessivas das forquilhas de replicação, as quais estão no momento de irradiação a distâncias que vão de zero até a própria distância interdímeros, em relação ao próximo dímero presente na cadeia-molde. O bloqueio acarretado pelo encontro do dímero não é todavia intransponível, já que uma compensação dos tempos de pulso se traduz em distribuições equivalentes de estruturas de replicação de DNA, em células irradiadas ou não (Figura 10).

Isto pode ser observado também na Figura 11, onde o procedimento experimental (ausência de pré-

pulso com BUdr) propicia uma melhor detecção das forquilhas de replicação. Também neste caso, a compensação de pulsos com análogo pesado se traduz em uma mesma densidade intermediária do DNA replicado, em ambas condições. Uma análise mais elaborada quanto às consequências da digestão prévia do DNA replicado após UV com S_1 endonuclease também foi possível. O tratamento enzimático mais uma vez não afetou os controles não irradiados, enquanto DNA replicado após UV é por sua vez fracionado em duas populações, uma de densidade híbrida e outra de densidade praticamente equivalente a DNA normal (ver Figura 11B). Adicionalmente, pôde-se verificar que DNA híbrido corresponde à população de L-DNA obtida em gradientes neutros de sacarose (conforme a figura 4) enquanto que H-DNA tem uma densidade muito próxima do normal (Figuras 11C e D).

Um modelo de replicação de DNA-molde contendo dímeros consistente com os resultados anteriormente discutidos e com o fato de metade do DNA sintetizado após UV ser refratário ao tratamento com S_1 -endonuclease (ver Figura 6 e 7), é sem dúvida aquele proposto inicialmente por MENE-
GHINI (1976). (Figura 21C). Por outro lado, foi possível elaborar um modelo de replicação de DNA mais detalhado, incorporando desta feita as diferentes informações obtidas do conjunto de dados experimentais (ver Figura 22).

Assumiu-se que a taxa de progressão da forquilha de replicação em células XP12RO é de $0,3 \mu/\text{minuto}$, valor este análogo aos obtidos por diferentes técnicas em várias linhagens celulares (PAINTER & SCHAEFER, 1969; EDENBERG & HUBERMAN, 1975; POVIRK & PAINTER, 1976). A extensão de

FIGURA 22. Modelo de síntese de DNA a partir de um molde lesoado por luz UV, em células de eucariotos. O modelo assume que o efeito do dímero (Δ) é dependente de estar em uma região do DNA-molde replicada de forma contínua (5'-3') ou numa região de síntese descontínua (3'-5'). No primeiro caso, a lesão constitui um bloqueio temporário para a progressão da forquilha de replicação. No segundo caso, a forquilha ignora a presença do dímero e progride até a próxima origem de um Fragmento de Okazaki. O fragmento é iniciado e alonga em sentido contrário ao do movimento da forquilha até o dímero ser alcançado. Assim, a elongação é bloqueada e uma lacuna estável é formada. O modelo também incorpora diferentes dados obtidos nesta tese (ver texto). Particularmente ele representa a forquilha de replicação de células XP12RO irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ e pulsadas por 45 minutos com precursor radiativo de DNA. O peso molecular da forquilha, após quebras mecânicas devidas ao processo de extração, é de $\approx 60 \times 10^6 \text{ d}$; (—) DNA sintetizado antes de irradiação, (---) DNA sintetizado após irradiação, durante o pulso com precursor marcado. As setas indicam regiões simples-fita passíveis de ataque por S_1 -endonuclease. Na escala inferior, $1 \mu\text{m}$ corresponde a $2^1 \times 10^6 \text{ d}$.

DNA replicado em 20 minutos nos controles, é equivalente àquela observada em 45 minutos nas células irradiadas com $12,5 \text{ J/m}^2$ de UV, devido ao fato de se observar a mesma distribuição em perfis de bandeamento (Figuras 10A,B, 11A,B). Deduz-se portanto que a forquilha de replicação, percorreu em média 6μ após UV (porção B-C da Figura 22). Como a distância interdímeros para a dose de UV fornecida corresponde a 4μ (MENECHINI & MENCK, resultados não publicados), conclui-se que em média 3 dímeros estão presentes nos dois segmentos B-C da Figura 22.

Além disso, outras estimativas baseadas nos resultados obtidos foram levadas em consideração:

a) o peso molecular médio de DNA obtido nas condições de extração e purificação aqui utilizadas varia de $55 \text{ a } 60 \times 10^6 \text{ d}$ (Tabela I), correspondendo à extensão AD do esquema da Figura 22;

b) uma vez que muitos replicons já estão ativos antes da irradiação UV, a porção de DNA replicada (AC) contém DNA sintetizado antes (AB) e depois da irradiação (BC). Isto pode ser deduzido pela comparação dos perfis de bandeamento obtidos, descrito nas Figuras 10B e 11B. Ademais, as extensões relativas das porções AB, BC e CD podem ser calculadas pelo deslocamento da densidade média de DNA calculada a partir dos perfis descritos nas Figuras 10B e 11B, de forma detalhada no "Apêndice". Estas densidades relativas correspondem a 0,70 e 0,38, respectivamente. Portanto, as cadeias entre AC correspondem a 70% da estrutura total AD, enquanto que os segmentos BC equivalem a 38%.

Ainda segundo o modelo proposto, lacunas opostas a dímeros são formadas quando a síntese de DNA é descontínua (3'-5'), enquanto que síntese contínua (5'-3') é temporariamente bloqueada por um dímero na cadeia molde, como exemplificado no ponto C. Apesar de ser um modelo interpretativo, a estrutura de DNA esquematizada na Figura 22 está de acordo com os resultados obtidos com S_1 -endonuclease. O ataque enzimático das lacunas (indicado por setas na Figura 22) resulta na liberação de 50% do DNA marcado na forma de L-DNA, de baixo peso molecular (Figura 6). A fração de H-DNA, de alto peso molecular (Figura 6 e Tabela 1) corresponde conseqüentemente do segmento AD remanescente (ver Figura 22), apresentando uma sensível diminuição de peso molecular (Tabela I) e de densidade relativa (Figura 11D), quando comparada com o DNA não submetido à digestão enzimática. Estas variações são todavia pequenas, como seria esperado no caso do segmento CD não replicado permanecer ligado a esta fração de DNA marcado (Figura 22).

Por outro lado, o fato da população de L-DNA diminuir gradualmente com o tempo pós-UV, apresentando concomitantemente uma elevação de seu peso molecular médio (Figura 9), sugere que as lacunas são preenchidas com o passar do tempo após UV. Contudo o preenchimento de lacunas segundo o modelo deve ser necessariamente mais lento que a progressão da forquilha, constituindo-se no passo limitante para a efetiva elongação do DNA replicado após UV.

Finalmente, os dados apresentados na Figura 15 enfatizam o argumento de que o DNA sintetizado após UV, próximo da forquilha de replicação, é o responsável pe-

lo aparecimento de duas populações de DNA após tratamento enzimático (Figura 15E), havendo porém a presença de lacunas já afastadas da forquilha de replicação (Figura 15F).

4. FREQUÊNCIA DE LACUNAS EM DNA REPLICADO APÓS UV

Segundo o modelo anteriormente descrito, a população de L-DNA obtida após digestão enzimática do DNA replicado após UV deve possuir um peso molecular médio no máximo equivalente ao de uma cadeia de DNA dupla-fita de extensão igual a dois dímeros consecutivos no DNA-molde. Nesse caso, supõe-se que um aumento da dose de UV, elevando consequentemente a frequência de dímeros no DNA-molde, acarreta uma diminuição correspondente do peso molecular médio de L-DNA. Esta previsão é plenamente satisfeita, como mostram os resultados da Figura 8, onde se observa um nítido declínio do peso molecular médio de L-DNA, à medida que se efetua um incremento da dose de UV fornecida. Este fenômeno é melhor caracterizado quando são plotados os perfis diferenciais de sedimentação (ver Figura 8, F a J).

Por outro lado, estes resultados permitiram a comparação entre a frequência de lacunas no DNA sintetizado após UV e a frequência correspondente de dímeros na cadeia-molde, como indicado na Tabela II. Verifica-se assim, uma forte relação causal entre os dois parâmetros, em doses de UV variando de 5 a 40 J/m², onde as distâncias interlacunas correspondem de 37% a 72% da distância interdímeros, respectivamente (Tabela II, coluna E), não obstante o conteúdo de L-DNA permanecer praticamente inalterado (Tabela II, coluna F).

De qualquer modo, as distâncias interlacunas encontradas mantiveram-se sempre inferiores às distâncias interdímeros, em todos os casos. Isto poderia ser explicado, ao menos em parte, pela própria distribuição de sítios sensíveis a S_1 -endonuclease na forquilha de replicação, como indicado no modelo da Figura 22. Assumiu-se anteriormente que dímeros presentes na cadeia copiada de forma contínua (5'-3') constituem bloqueios temporários de progressão da forquilha de replicação. Nesse caso, a fita oposta poderia conter uma região simples-fita adjacente à forquilha (indicado no ponto C da Figura 22), se o início de um novo fragmento de Okasaki estivesse impedido pelo próprio bloqueio da forquilha de replicação. Assim, a clivagem nucleolítica neste ponto e na lacuna adjacente proporcionariam também a formação de L-DNA, o qual teria porém um peso molecular médio equivalente à metade da distância interdímeros (ver Figura 22).

De qualquer maneira, estes desvios existentes entre as medidas de frequência de lacunas e frequência de dímeros poderiam ser alternativamente devidos a um erro sistemático no cálculo de ambos os parâmetros, neste caso efetuados de forma totalmente distinta.

5. EXTENSÃO DAS LACUNAS EM DNA REPLICADO APÓS UV

A abordagem experimental neste caso também envolveu o tratamento de DNA replicado após UV com S_1 endonuclease, baseando-se essencialmente na constatação de que a quantidade relativa de L-DNA formado depende da concentração de enzima presente (Figuras 17 e 18). Neste caso,

assumiu-se que um máximo de L-DNA é obtido quando a concentração de enzima é igual a 52,5 U/ml, onde a curva descrita na Figura 18 atinge um platô. Esta premissa é importante para o tratamento estatístico dos dados que será feita a seguir.

Presume-se que a clivagem nucleolítica é introduzida aleatoriamente ao longo da lacuna presente no DNA replicado após UV, e são definidos os seguintes parâmetros: N, concentração de quebras introduzidas pela nuclease; D, concentração de DNA simples-fita, susceptível de ataque enzimático; L, concentração de lacunas.

Assim, N/L representa o número de quebras introduzidas por lacuna, D/L é o tamanho da lacuna e pressupõe-se que a distribuição de quebras na população total de lacunas deve obedecer a uma distribuição de Poisson. Todas as classes exceto a classe zero devem então dar origem a L-DNA de tal forma que $\mu = e^{-N/L}$, onde μ representa a fração de L-DNA total que pode ser obtida, mas que permanece como DNA de alto peso molecular, após tratamento com uma dada concentração de enzima. Nesse caso, a ordenada da figura 18 corresponde a $1 - e^{-N/L}$. Se assumirmos que o número de quebras por lacuna é proporcional à concentração enzimática (E), e ao tamanho da lacuna (D/L), de tal modo que $N/L = KE D/L$, então a expressão anterior torna-se $\mu = e^{-KE.D/L}$, ou $\log \mu = -0,4343 K.E.D/L$, onde k representa a frequência de quebras por unidade de S_1 -endonuclease (quebras. $d^{-1}.U_{S_1}^{-1}$). Esta última premissa é confirmada pelos resultados da Figura 16. Observa-se que a frequência de quebras (N/D) calculada cresce linearmente com E, e K pôde ser determinado diretamente da inclinação da reta, e uma média obtida a partir de três experi

mentos distintos forneceu um valor de

$$1,75 \times 10^{-6} \text{ quebras.d}^{-1}.\text{U}_{\text{S}_1}.$$

É importante frisar que K não depende da concentração de DNA simples-fita (D), como indicam os resultados da Tabela III, nestas condições de ensaio enzimático N/D sendo portanto constante para um dado E. Nesse caso, é razoável supor que o K calculado para D relativamente elevado é equivalente a um D bem menor, como é o caso de lacunas em DNA dupla-fita.

Com base no raciocínio antes descrito, seria esperada uma relação linear entre $\log \mu$ e E, seguindo as equações $\log \mu = -0,4343 K.E.D/L$, e uma vez que K é conhecido, D/L (extensão das lacunas) poderia ser determinado pela inclinação da reta. A figura 23 mostra os valores médios de $\log \mu$ calculados a partir de vários experimentos, plotados em função de E. Surpreendentemente, nota-se que duas inclinações distintas são observadas, das quais uma corresponde a 65% das regiões simples-fita, isto é, aquela que é rapidamente atacada pela nuclease, enquanto que os restantes 35% correspondem a extensões de $4,5 \times 10^4$ d, ou cerca de 150 nucleotídeos. Quando é corrigida a inclinação correspondente à cinética rápida, subtraindo a contribuição dada pela cinética lenta, obtem-se um valor de 1250 nucleotídeos para a população de lacunas correspondendo a 65% do total. É necessário frisar que em 5 experimentos efetuados foi possível detectar estas duas inclinações distintas.

De acordo com o modelo de replicação anteriormente proposto, o tamanho das lacunas equivaleria em

FIGURA 23. Determinação da extensão das lacunas em DNA replicado após UV. Os valores de $\bar{\mu}$ estão representados em escala logarítmica e correspondem à média de duas ou mais determinações; μ representa a fração de L-DNA total que pode ser obtida mas que permanece como H-DNA após tratamento com a concentração de S₁-endonuclease indicada (ver texto para detalhes). Os valores de μ e seus respectivos desvios-padrão em concentrações crescentes de enzima) são $0,66 \pm 0,18$ (5); $0,46 \pm 0,08$ (2); $0,33 \pm 0,07$ (5); $0,29 \pm 0,16$ (2); $0,30 \pm 0,06$ (2); $0,27 \pm 0,07$ (5); $0,17 \pm 0,03$ (2); $0,12 \pm 0,07$ (5); $0,04 \pm 0,00$ (2). Os valores entre parênteses representam o número de experimentos efetuados.

média à metade da extensão de um fragmento de Okasaki, medida essa não disponível para as células XP12RO aqui utilizadas, mas que em outros eucariotos tem um valor de 100 a 200 nucleotídeos (EDENBERG & HUBERMAN, 1975). Nesse caso, apenas um terço das lacunas se encaixaria nesta previsão, enquanto que os dois terços restantes estariam mais de acordo com valores determinados utilizando uma metodologia totalmente diversa (LEHMANN, 1972; BUHL e col., 1972).

De qualquer modo, a correlação entre as lacunas e os fragmentos de Okasaki não pode ser descartada, uma vez que existe a possibilidade destas células possuírem diferentes famílias de fragmentos, variando de extensão de forma análoga às lacunas.

6. INDUÇÃO DE RPR EM CÉLULAS PREVIAMENTE IRRADIADAS COM UV

A existência de um processo induzido de RPR em eucariotos, análogo ao que ocorre em bactérias (VILLANI e col., 1978), foi primeiramente sugerida por D'AMBROSIO & SETLOW (1976). Os autores observaram que células V-79, quando submetidas a doses fracionadas de UV, apresentavam uma taxa de alongação de DNA posterior aumentada, quando comparada com a taxa obtida após uma dose única de UV, equivalente à somas das doses parceladas. A conclusão neste caso foi a de que a primeira dose de UV desencadearia um processo de indução de RPR. Mais recentemente, PAINTER (1978) contestou esta interpretação, fornecendo uma explicação alternativa para a aparente normalização da taxa de alongação de DNA.

Argumentou ele que os resultados obtidos poderiam ser explicados pelo próprio efeito inibitório sobre síntese de DNA promovido pela primeira dose de UV. Nesse caso, a primeira dose provocaria o aparecimento de uma distribuição anormal de tamanho de replicons atuantes, devido a uma diminuição de velocidade média de replicação de DNA. Assim, após a segunda exposição a luz UV, no momento do pulso, ocorreria uma marcação dos replicons grandes acumulados, os quais ainda não teriam sofrido o processo de junção com replicons adjacentes, devido à sua taxa de progressão lenta. A análise dos perfis de sedimentação de DNA assim obtidos indicaria portanto uma elevação artefactual do peso molecular médio de DNA, devido à contribuição da população de replicons maiores antes descritos.

Uma metodologia alternativa para a verificação de indução de RPR baseia-se na avaliação do conteúdo de lacunas em DNA recém-sintetizado longos tempos após UV ou após doses de UV fracionadas, comparando-se estes valores com os obtidos curto tempo após a irradiação com a mesma dose de UV. Isto é possível através da detecção de lacunas com S_1 -endonuclease, sendo este tipo de abordagem além do mais imune aos possíveis artefatos discutidos anteriormente, uma vez que independe do peso molecular prévio do DNA replicado após diferentes condições de exposição a luz UV.

A Figura 19 mostra um dos resultados obtidos de acordo com este enfoque. Nota-se uma diminuição bem caracterizada da quantidade de L-DNA obtido no caso de DNA replicado longo tempo após UV ou mesmo após doses parceladas, se comparado com o perfil obtido em tempos curtos após a

mesma dose total de UV. Estes fenômenos são por sua vez mais evidentes quando células V-79 estão na presença de cafeína, droga esta já descrita como um inibidor de RPR em células de roedores (LEHMANN & KIRK-BELL, 1974).

Por outro lado, os resultados descritos na Figura 20 foram obtidos a partir de um procedimento análogo aos descritos por D'AMBROSIO & SETLOW (1976) e PAINTER (1978). Nota-se que DNA recém-sintetizado longos tempos após UV ou mesmo após doses fracionadas de radiação é visivelmente maior que a distância interdímeros média no DNA-molde. Isto porém não ocorre no caso de DNA sintetizado imediatamente após uma dose única de UV (ver Figura 20).

Além disso, este fenômeno ocorre concomitantemente com a perda relativa do número de lacunas em DNA recém-replicado, medido na forma de percentual de L-DNA formado. Este resultado sugere fortemente que dímeros presentes no DNA-molde deixam de atuar como obstáculos à maquinaria de replicação, não acarretando a formação de descontinuidades no DNA replicado. Além disso, essa aparente normalização do processo de replicação de DNA é dependente do tempo pós-irradiação, já que duas doses de UV espaçadas por duas horas fornecem respostas distintas das obtidas com um intervalo de oito horas (ver Figura 20). No primeiro caso, o DNA recém-sintetizado tem um peso molecular mais próximo da distância interdímeros no DNA-molde, além de exibir um conteúdo relativo de lacunas maior.

Pelo menos duas hipóteses consistentes com estes dados podem ser aventadas. A primeira pressupõe que a maquinaria de replicação sofre uma modificação qualquer,

de natureza induzida, que possibilita a polimerização trans-dímero sem sofrer bloqueio, isto longo tempo após a primeira dose de UV. Assim, não haveria a formação de lacunas, estando a velocidade média de replicação normalizada, não obstante um possível prejuízo na fidelidade de cópia.

Uma segunda hipótese foi sugerida recentemente por DONIGER & DI PAOLO(1980). Em linhas gerais, admite-se nesse caso que ocorre uma alteração estrutural do dímero e/ou da cromatina adjacente, longo tempo após a irradiação UV. Esta hipotética alteração estrutural facultaria à maquinaria de replicação transpor os dímeros, sem prejuízo da taxa de elongação e sem criar descontinuidades no DNA recém replicado.

De qualquer modo, um dos resultados que aparecem na Figura 20 não é consistente com esta última hipótese. É o caso de células irradiadas com 5 J/m^2 e após um intervalo de 8 horas novamente irradiadas com 10 J/m^2 . Dessa maneira, no caso da segunda hipótese estar correta, seria esperado um comportamento análogo ao DNA replicado logo após uma única dose de 10 J/m^2 . Isto todavia não ocorre, sendo o DNA sintetizado após doses fracionadas mais refratário ao tratamento enzimático, além de exibir uma taxa de elongação aumentada em relação à observada após uma dose única de UV (ver Figura 20).

Estes resultados portanto são mais consistentes com a hipótese de ocorrer uma efetiva indução de RPR em crescentes tempos após a introdução de dímeros no genoma.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados e discutidos nesta tese indicam que dímeros de pirimidina, formados em DNA quando células são irradiadas com luz UV, constituem-se em obstáculos para a replicação de DNA, acarretando uma inibição tanto na elongação das novas cadeias como da taxa global de síntese, fenômenos estes já descritos anteriormente (LEHMANN, 1972; DONIGER, 1978).

Por outro lado, uma metodologia envolvendo a digestão de DNA replicado após UV com S_1 -endonuclease, específica para DNA simples-fita, permitiu detectar de forma inequívoca a presença de lacunas em DNA recém-sintetizado após UV. O conjunto de dados obtidos levou a considerar um modelo de síntese de DNA lesado por UV, segundo o qual os dímeros presentes em regiões replicadas de forma contínua (5'-3') representam bloqueios temporários para a progressão da forquilha de replicação, enquanto que no caso de replicação descontínua (3'-5') ocorre a formação de lacunas no DNA recém-sintetizado, numa região oposta ao dímero presente na cadeia-molde (CORDEIRO-STONE e col., 1979). Além disso, o modelo proposto assume que a síntese contínua (5'-3') de DNA, não obstante o bloqueio temporário, transpõe efetivamente o dímero encontrado, não havendo a formação de descontinuidades físicas no DNA replicado, enquanto que as lacunas formadas após síntese descontínua (3'-5') são preenchidas posteriormente, possivelmente por síntese de novo (LEHMANN, 1972).

Deve ser ressaltado que esta interpretação é diferente dos resultados obtidos por exemplo em bactérias, onde lacunas são formadas em ambas fitas de DNA replicado (RUPP e HOWARD-FLANDERS, 1968; GANESAN, 1974), em sistemas onde a presença de lesões acarreta um bloqueio permanente da replicação de DNA, como é o caso de DNA mitocondrial (CLAYTON e col., 1974), ou alternativamente a não-formação de lacunas opostas às lesões, como observado em vírus SV40 (SARASIN e HANAWALT, 1978). Isto implica que a extrapolação dos resultados aqui obtidos para outros sistemas deve ser encarada com reservas.

A mesma metodologia, baseada no ataque nucleolítico das lacunas permitiu determinar uma nítida relação causal entre a frequência de lacuna no DNA replicado e a frequência de dímeros no DNA-molde, sugerindo fortemente que as lacunas estão opostas a dímeros. Por outro lado, um tratamento estatístico adequado da cinética de clivagens enzimáticas das lacunas tornou possível a detecção de duas populações distintas de lacunas onde 35% correspondem a extensões de 150 nucleotídeos e os restantes 65% a 1250 nucleotídeos (MENECHINI e col., 1981). Contudo, apenas uma parte das lacunas corresponde às extensões esperadas segundo o modelo de replicação antes proposto, ou seja, equivalendo em média à metade de um fragmento de Okasaki, que em eucariotos varia de 100 a 200 nucleotídeos (EDENBERG & HUBERMAN 1975). Os dois terços restantes apresentam todavia uma extensão análoga às aquelas determinadas por metodologias totalmente diversas (LEHMANN, 1972; BUHL e col., 1972).

No momento, não é possível descartar a hipótese de ocorrerem na linhagem humana XP12RO famílias de fragmentos de Okasaki de extensões distintas, analogamente às lacunas, nem a possibilidade alternativa da eficiência de clivagem enzimática depender da posição da lacuna em relação à forquilha de replicação. Esta última hipótese é plausível, se considerarmos por exemplo que a lacuna mais próxima da forquilha representa um alvo menos acessível para o ataque de S_1 -endonuclease, dando assim origem a uma cinética bifásica de digestão enzimática.

Finalmente, as lacunas detectadas em DNA sintetizado em tempos curtos após UV deixam aparentemente de ser formadas em tempos crescentes após irradiação, não obstante o conteúdo de dímeros no DNA-molde persistir praticamente inalterado. Este fenômeno sugere fortemente a ocorrência de um mecanismo induzido de tolerância às lesões no DNA-molde, como já proposto (D'AMBROSIO & SETLOW, 1976). Este processo facultaria a efetiva duplicação do genoma, em prejuízo possivelmente da fidelidade de cópia, de forma análoga ao mecanismo SOS descrito em bactérias (VILLANI e col., 1978).

Esta hipótese, apesar de especulativa, vem de encontro a dados recentes, onde se verificou que células V-79 de hamster chinês apresentam uma normalização tanto da velocidade média de replicação de DNA como da taxa global de síntese, isto ocorrendo longo tempo após UV e sem que tenha havido uma remoção significativa dos dímeros do DNA-molde (DAHLE e col., 1980).

Uma vez que recombinação parece desempenhar um papel pouco importante no contorno das lesões em eu-

cariotos, síntese translesão de DNA deve ter um papel importante neste processo, o qual permite às células sobreviverem e proliferarem, mesmo com um conteúdo substancial de lesões no genoma.

Todavia, a elucidação ao nível bioquímico dos mecanismos que propiciam a cópia direta de uma lesão não-codificadora no DNA-molde permanece uma questão aberta. Isto se deve em grande parte a limitações técnicas que existem no presente, principalmente no que se refere à nossa capacidade de detectar alterações possivelmente sutis e relativamente pouco frequentes na estrutura de DNA, no ponto onde ocorreu síntese translesão.

Parece evidente que ensaios in vitro utilizando DNA-molde de sequência conhecida, serão muito provavelmente fundamentais para a compreensão ao nível molecular dos mecanismos de tolerância a lesões, não obstante o risco inerente de conclusões exageradamente simplistas. Isto porque não é possível considerar nestas condições a provável relevância in vivo de uma estrutura complexa como é o caso de cromatina. Um meio termo plausível é a utilização de sistema de células permeabilizadas, neste caso havendo para todos os efeitos uma replicação normal de DNA, e analisando-se porções do genoma de sequência altamente reiterada, passíveis de serem mapeadas detalhadamente através de enzimas de restrição.

Finalmente, cabe acrescentar que o eventual isolamento de mutantes defectivos no processo de indu-

ção de RPR permitiria a comparação direta das respostas biológicas decorrentes da introdução de lesões no genoma, isto acarretando um substancial aumento do número de informações disponíveis acerca desta área de investigação.

V. RESUMO

Estudou-se o comportamento frente a radiação UV de células humanas XP12RO, deficientes em reparo-excisão de dímeros de pirimidina. Cinéticas de incorporação de precursor radiativo de DNA em tempos crescentes após a exposição a UV mostraram uma rápida inibição da taxa de síntese, até se alcançar um platô bem abaixo do valor obtido para células não irradiadas. Tanto o tempo para que este platô fosse alcançado quanto o valor basal de síntese obtido dependiam da dose de UV fornecida. Este tempo era compatível com o necessário para que a maquinaria de replicação percorresse a distância média interdímeros esperada para a dose de UV aplicada.

Verificou-se também que o DNA recém-sintetizado após UV apresentava um peso molecular e uma taxa de alongação bem menores que nos controles não irradiados, sugerindo todos estes resultados que o dímero se constitui num bloqueio temporário para a replicação de DNA.

Utilizando uma metodologia baseada no tratamento do DNA nativo com S_1 endonuclease de Aspergillus oryzae, específica para DNA simples-fita, foi possível detectar a existência de lacunas de DNA replicado após UV, lacunas estas que desaparecem gradativamente com o passar do tempo pós-irradiação. DNA não irradiado manteve-se refratário à enzima, nas mesmas condições.

A digestão enzimática acarretava o aparecimento de duas populações distintas de DNA, uma de alto peso molecular e outra de peso molecular bem menor, ambas se equivalendo em quantidade. Este fenômeno pôde ser observado em uma ampla faixa de doses de UV, tanto em células XP12RO como em outras linhagens celulares, e mesmo sob condições diversas de proliferação celular. Além disso, o desaparecimento das lacunas, no caso de células de roedor previamente irradiadas com UV, era retardado pela presença de cafeína, um conhecido inibidor de reparo pós-replicação (RPR) nestas linhagens.

Foi efetuada uma análise da progressão da forquilha de replicação e da distribuição de lacunas do DNA replicado após UV, através de ensaios enzimáticos combinados com bandejamento de DNA em gradientes isopícnicos de CsCl. Os resultados assim obtidos levaram-nos a considerar um modelo de replicação a partir de molde lesado onde síntese descontínua (3'-5') propicia a formação de lacunas, enquanto que síntese contínua (5'-3') é retardada temporariamente pela presença da lesão, sem contudo acarretar a formação de descontinuidades físicas no DNA replicado.

A mesma metodologia de digestão de DNA com S_1 endonuclease permitiu verificar a ocorrência de uma nítida relação causal entre a frequência de lacunas e a frequência correspondente de dímeros, em crescentes doses de UV, sugerindo fortemente que dímeros estão opostos às lacunas no DNA recém sintetizado. Além disso, um tratamento estatístico da cinética de clivagens enzimáticas observada para as lacunas

tornou possível calcular a extensão física destas, detectando-se a presença de duas populações distintas, onde 65% correspondem a 1250 nucleotídeos e 35% correspondem a 150 nucleotídeos.

Finalmente, foi verificado que DNA recém-sintetizado longos tempos após UV apresenta um drástico declínio da frequência de lacunas, não obstante a frequência de dímeros permanecer essencialmente inalterada. Estes resultados favorecem a hipótese de ocorrer um processo induzido de RPR, o qual permitiria à maquinaria de replicação transpor eficientemente os dímeros presentes, apesar destes não terem propriedades codificadoras.

VI. SUMMARY

The synthesis of DNA in human XP12RO cells, deficient in excision repair of pyrimidine dimers was studied. The rate of incorporation of radioactive precursors into DNA was measured at different times after irradiation. The DNA synthesis decreases shortly after irradiation, reaching a plateau whose value and time to be attained was dependent on the UV dose. This time period was the one expected for the replication machinery to cover the interdimer distance at the UV dose applied.

It was also verified that the newly synthesized DNA after UV irradiation presented much smaller molecular weight and elongation rate, when compared with the non-irradiated controls. These results suggest that the dimer imposes a delay to DNA replication machinery.

Using a methodology based on the treatment of native DNA with S_1 -endonuclease from Aspergillus orizae, specific for single-stranded DNA, it was possible to detect gaps in the DNA replicated after UV treatment. These gaps disappeared gradually with time after irradiation. The non-irradiated DNA remained refractory to the enzyme, under the same experimental conditions.

The enzymatic digestion originated approximately equal amounts of two distinct double-stranded DNA populations, one of high molecular weight and other of much smaller molecular weight. This phenomenon could be seen on a wide range of UV doses, in XP12RO cells as well as in

other cells lines, and did not depend on the particular conditions of cell proliferation. Furthermore, the gap disappearance, in the case of rodent cells previously irradiated with UV, was delayed by the presence of caffeine, a known post-replication repair (PRR) inhibitor in these cell lines.

An analysis of the progression of the replication fork and of the distribution of gaps in the DNA replicated after UV irradiation was carried out through enzymatic assays combined with DNA banding in isopycnic CsCl gradients. The results thus obtained led us to consider a model for replication on damaged template, whereby gaps are formed only in the strand replicating opposite the fork movement (3'-5'). The strand replicating in the same direction as the fork movement (5'-3') is temporarily delayed by the presence of the lesion, without originating gaps in the replicative DNA.

The same methodology of DNA digestion with S_1 -endonuclease permitted us to verify the occurrence of a nitid relationship between the gap frequency and the corresponding dimer frequency, for different doses of UV, strongly suggesting that the dimers are opposite the gaps in the newly-synthesized DNA.

Furthermore, an statistical analysis of the dependende of DNA cleavage by S_1 -endonuclease on the enzyme concentration rendered it possible to calculate the size of the gaps. Two distinct populations were detected, 65% corresponding to 1250 nucleotides and 35% corresponding to 150 nucleotides.

Finally, it was verified that the nascent DNA synthesized long periods after UV are essentially free of gaps although the dimer frequency remained almost unaltered. These results favour the hypothesis of the occurrence of an induced process of PRR, which would permit the replication machinery to efficiently bypass the dimers, in spite of the fact that these lesions do not exhibit codifying properties.

VII. APÊNDICE

É possível calcular-se as densidades médias relativas de moléculas de DNA, após incorporação de análogo pesado. Neste caso, assume-se que a população de moléculas de DNA possui regiões de diferentes extensões de marcação com BUdr. Definindo-se a densidade relativa de uma dada molécula como $d_i = \rho - \rho_o / \rho_h$ onde ρ é a densidade real, ρ_o a densidade de DNA normal não-substituído e ρ_h a densidade de moléculas híbridas, contendo BUdr em toda a sua extensão. Nesse caso, d_i corresponde à fração da extensão da molécula marcada com BUdr. Quando consideramos a densidade relativa média de toda a população, temos que $d_a = \sum n_i d_i / \sum n_i$, onde n_i , é o número de moléculas com densidade relativa d_i . Assim d_a varia de 0 a 1 e representa a densidade relativa média da população. Por outro lado, pode ser assumido que os pesos moleculares médios de DNA são os mesmos para as populações de diferentes d_i . Como nesse caso a marcação de densidade é proporcional ou mesmo equivalente à marcação radiativa, temos que $n_i = k \cdot r_i / d_i$, onde k é uma constante independente de i e r_i é a radiatividade total contida na fração de densidade d_i . Portanto

$$d_a = \sum r_i / \sum (r_i / d_i),$$

por simples substituição. Uma vez que os gradientes de densidade obtidos experimentalmente são lineares, d_a pôde ser calculado com precisão, tendo sido considerados todos valores na faixa $0 < d_i \leq 1$.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- AARONSON, S.A. & LYTLE, C.D. (1970). Decreased host cell re-activation of irradiated SV40 virus in xeroderma pigmentosum. Nature, Lond., 228: 359-361.
- BANNON, P. & VERLY, W. (1972). Alkylation of phosphates and stability of phosphate triesters in DNA. Eur. J. Biochem. 31:103-111.
- BARRET, J.C. & Ts'o, P.O.P. (1978). Relationship between somatic mutation and neoplastic transformation. Proc.Natn.Acad. Sci. U.S.A. 75:3297-3301.
- BEUKERS, R. & BERENDS, W. (1960). Isolation and identification of the irradiation product of thymine. Biochim. Biophys. Acta, 41:550-551.
- BOCKSTAHLER, L.E. & LYTLE, C.D. (1977). Radiation enhanced re-activation of nuclear replicating mammalian viruses. Photochem. & Photobiol., 25:477-482.
- BOREK, C. (1980). X-ray induced in vitro neoplastic transformation of human diploid cells. Nature, Lond., 283:776-777.
- BOYCE, R. & HOWARD-FLANDERS, P. (1964). Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E. coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 51:293-300.
- BRIDGES, B.A. (1978). The involvement of E. coli DNA polymerase III in constitutive and inducible mutagenic repair. In: DNA Repair Mechanisms (ed. P.C. Hanawalt, E.C.Friedberg and C.F. Fox), pp. 345-348. New York, Academic Press.
- BRIDGES, B.A. & SEDGWICK, S.G. (1974). Effect of photoreactivation on the filling of gaps in deoxyribonucleic acid synthesized after exposure of Escherichia coli to ultraviolet light. J. Bacteriol., 117:1077-1081.

- BUHL, S.N., SETLOW, R.B. & REGAN, J.D. (1972). Steps in DNA chain elongation and joining after ultra-violet irradiation of human cells. Int. J. Rad. Biol., 22:417-424.
- BUHL, S.N., SETLOW, R.B. & REGAN, J.D. (1973). Recovery of the ability to synthesize DNA in segments of normal size at long times after UV irradiation of human cells. Biophys. J., 13:1265-1275.
- BUHL, S.N., STILLMAN, R.M., SETLOW, R.B. & REGAN, J.D. (1972). DNA chain elongation and joining in normal human and xeroderma pigmentosum cells after UV-irradiation. Biophys. J., 12:1183-1191.
- CAILLET-FAUQUET, P., DEFAIS, M. & RADMAN, M. (1977). Molecular mechanisms of induced mutagenesis. Replication in vivo of bacteriophage ϕ x 174 single-stranded, UV light-irradiated DNA in intact and irradiated host cells. J. Mol. Biol., 117:95-110.
- CALVERT, J.G. & PITTS, J.N. (1966). Photochemistry. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp. 783-786.
- CARRIER, W.L. & SETLOW, R.B. (1970). Endonuclease from Micrococcus luteus which has activity toward ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid: purification and properties. J. Bacteriol., 102:178-186.
- CARRIER, W.L. & SETLOW, R.B. (1971). A paper strip method for assaying gradients containing radioactive macromolecules. Anal. Biochem., 43:427-432.
- CHAN, G.L. & LITTLE, J.B. (1979). Resistance of plateau-phase human normal&XP fibroblasts to the cytotoxic effect of UV light. Mutat. Res., 63:401-412.

- CLARKSON, J.M. & HEWITT, R.R. (1976). Significance of dimers to the size of newly-synthesized DNA in UV-irradiated Chinese hamster ovary cells. Biophys. J., 16:1155-1164.
- CLAYTON, D.A., DODA, J.N. & FRIEDBERG, E.C. (1974). The absence of pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71:2777-2781.
- CLEAVER, J.E. (1969). Xeroderma pigmentosum: a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:428-435.
- CLEAVER, J.E. & THOMAS, G.H. (1969). Single strand interruptions in DNA and the effect of caffeine in Chinese hamster cells irradiated with UV-light. Biochem. Biophys. Res. Commun., 36:203-208.
- COLLINS, J.M. (1977). Deoxyribonucleic acid structure in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate. J. Biol. Chem., 252:141-147.
- COOK, J.S. (1965). The quantitative interrelations between ion fluxes, cell swelling, and radiation dose in ultraviolet hemolysis. J. Gen. Physiol., 48:719-734.
- COOK, J.S. (1972). Photoenzymatic repair in animal cells. In: Molecular and cellular repair processes (ed. R.F. Beers, R.M. Herriot and R.C. Tilehman) pp. 79-103. Baltimore, The John Hopkins University Press.
- CORDEIRO, M. & MENECHINI, R. (1973). The rate of DNA replication in the polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae. J. Mol. Biol., 78:261-274.

- CORDEIRO-STONE, M., SCHUMACHER, R.I. & MENEHINI, R. (1979). Structure of replication fork in UV light irradiated human cells. Biophys. J., 27:287-300.
- DAHLE, D., GRIFFITHS, T.D. & CARPENTER, J.G. (1980). Inhibition and recovery of DNA synthesis in UV-irradiated Chinese hamster V-79 cells. Photochem. & Photobiol., 32:157-165.
- D'AMBROSIO, S.M., AEBERSOLD, P.M. & SETLOW, R.B. (1978). Enhancement of post-replication repair in UV light irradiated Chinese hamster cells by irradiation in G₂ or S phase. Biophys. J., 23:71-78.
- D'AMBROSIO, S.M. & SETLOW, R.B. (1976). Enhancement of post-replication repair in Chinese hamster cells. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 73:2396-2400.
- DAS GUPTA, U.B. & SUMMERS, W.C. (1978). UV reactivation of herpes simplex virus is mutagenic and inducible in mammalian cells. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 75:2378-2381.
- DAY, R.S., III (1974). Cellular reactivation of UV-irradiated human adenovirus 2 in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. Photochem. & Photobiol., 19:9-13.
- DIPPLE, A., BROOKES, P., MACKINTOSH, D. & RAYMAN, M. (1971). Reaction of 7-bromomethylbenz(α) anthracene with nucleic acids, polynucleotides and nucleosides. Biochemistry, 10:4323-4330.
- DOMON, M. & RAUTH, A.M. (1973). Cell cycle specific recovery from fractionated exposures to UV light. Radiat. Res., 55:81-92.

- DONIGER, J. (1978). DNA replication in UV light irradiated Chinese hamster cells: the nature of replicon inhibition and post-replication repair. J. Mol. Biol., 120:433-446.
- DONIGER, J. & DI PAOLO, J.A. (1980). The early and late modes of DNA replication in UV irradiated Syrian hamster embryo cells. Biophys. J., 31:247-254.
- EDENBERG, H.J. (1976). Inhibition of DNA replication by UV light. Biophys. J., 16:849-859.
- EDENBERG, H. & HUBERMAN, J. (1975). Eukaryotic chromosome replication. A. Rev. Genet., 9:245-284.
- EHMANN, U.K. & LETT, J.T. (1973). Review and evaluation of molecular weight calculations from the sedimentation profiles of irradiated DNA. Radiat. Res., 54:152-162.
- ELKIND, M.M. & SUTTON, H. (1960). Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. Radiat. Res., 13: 556-593.
- FUJIWARA, Y. & TATSUMI, M. (1976). Replicative bypass repair of UV-damage to DNA of mammalian cells: caffeine sensitive and caffeine resistant mechanisms. Mutat. Res., 37: 91-110.
- GANESAN, A. (1974). Persistence of pyrimidine dimers during post replication repair in UV light irradiated E. coli K 12. J. Mol. Biol., 87:103-119.

- GANESAN, A.K. & SEAWELL, P.C. (1975). The effect of lex A and rec F mutations on post-replication repair and DNA synthesis in E. coli K-12. Molec. & Gen. Genet., 141:189-205.
- GORDON, M.P. (1975). Photorepair of RNA. In: Molecular mechanisms for repair of DNA (ed. P.C. Hanawalt and R.B. Setlow) pp. 115-121. New York, Plenum Press.
- HANAWALT, P.C., COOPER, P.K., GANESAN, A.K. & SMITH, C.A. (1979). DNA repair in bacteria and mammalian cells. A. Rev. Biochem. 48:783-836.
- Handbook of Biochemistry (1970). (ed. H.A. Sober) The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.
- HOFFMANN, M.E. & MENEHINI, R. (1979). DNA strand breaks in mammalian cells exposed to light in the presence of riboflavin and tryptophan. Photochem. & Photobiol., 29: 299 - 303.
- HUBERMAN, J.A. & RIGGS, A.D. (1968). On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. J. Mol. Biol., 32:327-341.
- IKENAGA, M. & KAKUNAGA, T. (1977). Excision of 4-nitroquinoline-1-oxide damage and transformation in mouse cells. Cancer Res., 37:3672-3678.
- IYER, V. & RUPP, W. (1971). Usefulness of benzoylated naphthoylated DEAE cellulose to distinguish and fractionate double stranded DNA bearing different extents of single stranded regions. Biochim. Biophys. Acta, 228:117-126.

- KAKUNAGA, T. (1974). Requirement for cell replication in the fixation and expression of the transformed state in mouse cells treated with 4-nitroquinoline-1-oxide. Int. J. Cancer, 14:736-742.
- KAKUNAGA, T. (1978). Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts cells by chemical carcinogens. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 75: 1334-1338.
- KATO, H. (1973a). Induction of sister chromatid exchanges induced by UV irradiation. Nature, Lond., 249:552-553.
- KATO, H. (1973b). Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. Exptl. Cell Res., 82:383-390.
- KATO, K. & STRAUSS, B. (1974). Accumulation of an intermediate in DNA synthesis by HEp.2 cells treated with methyl methanesulfonate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1969-1973.
- KAUFMANN, W.K. & CLEAVER, J.E. (1981). Mechanisms of inhibition of DNA replication by ultraviolet light in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts. J. Mol. Biol., 149:171-187.
- KAUFMANN, W.K., CLEAVER, J.E. & PAINTER, R.B. (1980). UV radiation inhibits replicon initiation in S phase human cells. Biochim. Biophys. Acta, 608:191-195.
- KINSELLA, A.R. & RADMAN, M. (1980). Inhibition of carcinogen-induced chromosomal aberrations by an anticarcinogenic protease inhibitor. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 77:3544 - 3547.

- KRAMER, K.H., COON, H.G., PETINGA, R.A., BARRET, S.F., RAHE, A.E. & ROBBINS, J.H. (1975). Genetic heterogeneity in xeroderma pigmentosum: Complementation groups and their relationship to DNA repair rates. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72:59-63.
- KRISHNAN, D. & PAINTER, R.B. (1973). Photoreactivation and repair replication in kangaroo cells. Mutat. Res., 17: 213-222.
- LAWLEY, P. (1973). Reaction of N-methyl-N-nitrosourea with ³²P-labeled DNA: Evidence for formation of phosphotriesters. Chem.-Biol. Interact., 7:127-130.
- LEHMANN, A.R. (1972). Postreplication repair of DNA in UV-irradiated mammalian cells. J. Mol. Biol., 66:319-337.
- LEHMANN, A.R. & KIRK-BELL, S. (1972). Postreplication repair of DNA in UV-irradiated mammalian cells. No gaps in DNA synthesized late after UV-irradiation. Eur. J. Biochem., 31:438-445.
- LEHMANN, A.R. & KIRK-BELL, S. (1974). Effect of caffeine and theophylline on DNA synthesis in unirradiated and UV-irradiated mammalian cells. Mutat. Res., 26:73-82.
- LEHMANN, A.R. & KIRK-BELL, S. (1978). Pyrimidine dimer sites associated with the daughter DNA strands in UV-irradiated human fibroblasts. Photochem. & Photobiol., 27:297-307.
- LEHMANN, A.R., KIRK-BELL, S. & MAYNE, L. (1979). Abnormal kinetics of DNA synthesis in UV-light irradiated cells from patients with Cockayne's syndrome. Cancer Res., 39: 4237-4241.

- LEHMANN, A.R. & STEVENS, S. (1975). Postreplication repair of DNA in chick cells: studies using photoreactivation. Biochim. Biophys. Acta, 402:179-187.
- LEY, R.D. (1973). Post replication repair in an excision-defective mutant of E. coli. UV light-induced incorporation of bromodeoxyuridine into parental DNA. Photochem. & Photobiol., 18:87-95.
- LINDAHL, T. (1976). New class of enzymes acting on damaged DNA. Nature, Lond., 259:64-66.
- LINDAHL, T. & NYBERG, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry, 11:3610-3618.
- LIPPKE, J.A., GORDON, L.K., BRASH, D.E. & HASELTINE, W. A. (1981). Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:3388-3392.
- LYTLE, C.D., AARONSON, S.A. & HARVEY, E. (1972). Host cell reactivation in mammalian cells. II. Survival of herpes simplex virus and vaccinia virus in normal human and xeroderma pigmentosum cells. Int. J. Rad. Biol., 22:159-165.
- LYTLE, C.D., DAY, R.S., HELLMAN, K.B. & BOCKSTAHLER, L. E. (1976). Infection of UV-irradiated normal human and XP fibroblasts by herpes simplex virus: studies on capacity and Weigle reactivation. Mutat. Res., 36:257-264.

- LYTLE, C.D. & GODDARD, J.G. (1979). UV-enhanced virus reactivation in mammalian cells: effects of metabolic inhibition. Photochem. & Photobiol., 29:959-962.
- MAHER, V.M., CURREN, R.D., OUELLETTE, L.M. & McCORMICK, J.J. (1976a). Effect of DNA repair on the frequency of mutations induced in human cells by UV irradiation and by chemical carcinogens. In Fundamentals in Cancer Prevention (ed. P.N. Magee, S. Takayama and T. Sugimura), pp. 363-382. University of Tokyo Press.
- MAHER, V.M., DORNEY, D.J., MENDRALA, A.L., KONZE-THOMAS, B. & McCORMICK, J.J. (1979). DNA excision repair processes in human cells eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of UV irradiation. Mutat. Res., 62:311-323.
- MAHER, V.M., OUELLETTE, L.M., CURREN, R.D. & McCORMICK, J.J. (1976b). Frequency of UV light-induced mutations is higher in xeroderma pigmentosum variant cells than in normal human cells. Nature, Lond., 261:593-595.
- MARTIN, R.G. & AMES, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of Enzymes: Application to protein mixtures. J. Biol. Chem., 236:1372-1379.
- MENECHINI, R. (1976). Gaps in DNA synthesized by UV-light-irradiated WI38 cells. Biochim. Biophys. Acta, 425:419-427.
- MENECHINI, R., CORDEIRO-STONE, M. & SCHUMACHER, R.I. (1981). Size and frequency of gaps in newly synthesized DNA of xeroderma pigmentosum human cells irradiated with UV light. Biophys. J., 33:81-92.

- MENECHINI, R. & HANAWALT, P.C. (1976). T₄ endonuclease sensitive sites in DNA from UV irradiated human cells. Biochim. Biophys. Acta, 425:428-434.
- MENECHINI, R. & MENCK, C.F. (1978). Pyrimidine dimers in DNA strands of mammalian cells synthesized after UV-irradiation. In DNA Repair Mechanisms (ed. P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C.F. Fox), pp. 493-497. New York: Academic Press.
- MENCK, C.F.M. & MENECHINI, R. (1981). Resistance of 3T3 mouse cells to UV light in relation to dimer excision and transfer of dimers to daughter strands. Photochem. & Photobiol., no prelo.
- MEYN, R., KASSCHAU, M.R. & HEWITT, R. (1977). The recovery of normal DNA replication kinetics in UV-irradiated Chinese hamster cells. Mutat. Res., 44:129-138.
- MEYN, R.E. & HUMPHREY, R.M. (1971). DNA synthesis in UV-light irradiated Chinese hamster cells. Biophys. J., 11: 295-301.
- MILLER, E. & MILLER, J. (1969). Studies on the mechanism of activation of aromatic amine and amide carcinogens to ultimate carcinogenic electrophilic reactants. Ann. N.Y. Acad. Sci., 163:731-750.
- MILLO, G.E. & DI PAOLO, J.A. (1978). Neoplastic transformation of human diploid cells in vitro after chemical carcinogen treatment. Nature, Lond., 275:130-132.
- MOORE, P.D., BOSE, K.K., RABKIN, S.D. & STRAUSS, B.S. (1981). Sites of termination of in vitro DNA synthesis on ultraviolet- and N-acetylaminofluorene-treated ØX 174 templates

by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 78:110-114.

MOORE, P. & STRAUSS, B.S. (1979). Sites of inhibition of in vitro DNA synthesis in carcinogen and UV-treated ØX-174 DNA. Nature, Lond., 278:664-666.

MOUSTACCHI, E., EHMANN, U.K. & FRIEDBERG, E.C. (1979). Defective recovery of semi-conservative DNA synthesis in XP cells following split dose UV-irradiation. Mutat. Res., 62:159-171.

MYHR, B.C., TURNBULL, D. & DI PAOLO, J.A. (1979). UV mutagenesis of normal and xeroderma pigmentosum variant human fibroblast. Mutat. Res., 62:341-353.

NAKANO, S., YAMAGAMI, H. & TAKAKI, R. (1979). Enhancement of excision-repair efficiency by conditioned medium from density-inhibited cultures in V-79 Chinese hamster cells: evidence for excision repair as an error-free repair process. Mutat. Res., 62:369-381.

NATARAJAN, A.T., VAN ZEELAND, A.A., VERDEGAAL-IMMERZEEL, P. A.M. & FILON, A.R. (1980). Influence of photoreactivation on biological effects induced by UV irradiation of eukaryotic cells. VIIth Int. Congr. Photobiology, Abstracts, p. 273.

PAINTER, R.B. (1978). Does UV light enhance postreplication repair in mammalian cells. Nature, Lond., 275:243-245.

PAINTER, R.B. & SCHAEFER, A.W. (1969). Rate of synthesis along replicons of different kinds of mammalian cells. J. Mol. Biol., 45:467-479.

- PERRY, P. & EVANS, H.J. (1975). Cytological detections of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature, Lond., 258:121-125.
- POVIRK, L.F. & PAINTER, R.B. (1976). Rate of DNA chain elongation in UV-light-irradiated mammalian cells as estimated by a bromodeoxyuridine photolysis method. Biophys. J., 16:883-889.
- RASMUSSEN, R.E. & PAINTER, R.B. (1964). Evidence for repair of UV damaged DNA in cultured mammalian cells. Nature, Lond., 203:1360-1362.
- REGAN, J. & SETLOW, R. (1974). Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. Cancer Res., 34:3318-3325.
- ROBBINS, J.H. (1979). New forms of diseases with DNA repair defects. Photochem. & Photobiol., 30:739-741.
- ROSENSTEIN, B.S. & SETLOW, R. (1980). DNA repair after UV irradiation of ICR 2A frog cells: pyrimidine dimers are long acting blocks to nascent DNA synthesis. Biophys. J., 31:195-205.
- RUPP, W.D. & HOWARD-FLANDERS, P. (1968). Descontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of E. coli following UV-irradiation. J. Mol. Biol., 31:291-304.
- RUPP, W.D., WILDE III, C.E., RENO, D.L. & HOWARD-FLANDERS, P. (1971). Exchanges between DNA strands in UV-irradiated E. coli. J. Mol. Biol., 61:25-44.

- SARASIN, A.R. & HANAWALT, P.C. (1978). Carcinogens enhance survival of UV-irradiated simian virus 40 in treated monkey kidney cells: induction of a recovery pathway. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 75:346-350.
- SETLOW, R. & CARRIER, W. (1964). The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 51:226-231.
- SETLOW, R.B. & HART, R.W. (1975). Direct evidence that damaged DNA results in neoplastic transformation - a fish story. In Proc. 5th Int. Congr. Radiation Research (ed. O-F. Nyggard, H.I. Adler and W.K. Sinclair), pp. 879-884. New York, Academic Press.
- SETLOW, R.B. & SETLOW, J.K. (1962). Evidence that UV-induced thymine dimers in DNA cause biological damage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 48:1250-1257.
- SIMON, J.W.I.M. (1979). Development of a liquid-holding technique for the study of DNA-Repair in human diploid fibroblasts. Mutat. Res., 59:273-283.
- SINGER, B. (1976). All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents. Nature, Lond., 264: 333-339.
- SMITH, K.C. & MEUN, D.H.C. (1970). Repair of radiation-induced damage in E. coli. I. Effect of rec mutations on post-replication repair of damage due to UV radiation. J. Mol. Biol., 51:459-472.
- STUDIER, F.W. (1965). Sedimentation studies of the size and shape of DNA. J. Mol. Biol., 11:373-390.

SUTHERLAND, B.M., DELIHAS, N.C. & SUTHERLAND, J.C. (1980).

UV transformation of human cells to anchorage independent growth: Action spectrum. VIIIth Int. Congr. Photobiologie Abstract, p. 283.

TATSUMI, K. & STRAUSS, B.S. (1979). Accumulation of DNA growing points in caffeine treated human lymphoblastoid cells. J. Mol. Biol., 135:435-449.

TAYLOR, J.H. (1959). The organization and duplication of genetic material. Proc. 10th. Int. Congr. Genet., Montréal, 1:63-78.

TODD, P. (1973). Fractionated UV light irradiation of cultured Chinese hamster cells. Radiat. Res., 55:93-100.

TROSKO, J.E. & CHU, E.H.Y. (1973). Inhibition of repair of UV-damaged DNA by caffeine and mutation induction in Chinese hamster cells. Chem.-Biol. Interact., 6:317-332.

TROSKO, J.E., CHU, E.H.Y. & CARRIER, W.L. (1965). The induction of thymine dimers in ultraviolet irradiated mammalian cells. Radiat. Res., 24:667-672.

VILLANI, G., BOITEUX, S. & RADMAN, M. (1978). Mechanism of UV-induced mutagenesis: Extent and fidelity of in vitro DNA synthesis on irradiated templates. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 75:3037-3041.

VOGT, V.M. (1973). Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from Aspergillus oryzae. Eur. J. Biochem., 33:192-200.

WATSON, J.D. & CRICK, F.H.C. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, Lond., 171: 964-967.

- WEIGLE, J.J. (1953). Induction of mutations in a bacterial virus. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 39:628-636.
- WITKIN, E.M. (1969). Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Annu. Rev. Microbiol., 23:487-510.
- WOLFF, S., BODYCOTE, J. & PAINTER, R.B. (1974). Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. Mutat. Res., 25; 73-81.

IX. ABREVIATÖES

Abs ₂₆₀	- Absorbância de uma solução medida no comprimento de onda de 260 nanômetros
BUdr	- 5'-bromodesoxiuridina
Ci	- Curie = $2,2 \times 10^{12}$ desintegrações por minuto
cpm	- Contagens por minuto. Número de desintegrações por minuto medido nas condições experimentais
¹⁴ C.Tdr	- Timidina. (metil-carbono 14)
d	- dalton (unidade de massa correspondente a um átomo de hidrogênio)
DME	- "Dulbecco's modified Eagle", meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
DNA- ¹⁴ C	- Ácido desoxiribonucleico marcado com carbono 14
DNA- ³ H	- Ácido desoxiribonucleico marcado com trítio.
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetraacético
EcoRI	- Enzima de restrição I purificada de <u>E. coli</u>
FUdr	- 5'-fluordesoxiuridina
³ H-Tdr	- Timidina- (metil-trítio)
J	- Joule (unidade de energia correspondendo a 1 watt x segundo)
Mn	- Peso molecular médio
nm	- nanômetro
nmw&	- "Nominal molecular weight limit", limite de exclusão de peso molecular em ultrafiltração
POPOP	- 1,4-bis 2-(5-fenil-oxazolil) benzeno

PPO	- 2,5-difeniloxazol
ρ	- densidade (gramas/cm ³)
RNA	- Ácido ribonucleico
rpm	- rotações por minuto
RPR	- Reparo pós-replicação
S	- Constante de sedimentação
SB	- Soro bovino
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SFB	- Soro fetal bovino
SV40	- "Simian virus 40", vírus 40 de simio
TCA	- Ácido tricloroacético
Tdr	- Timidina
TRIS	- tris-hidroximetil-aminometano
TSF	- Tampão salina-fosfato
Ur	- Uridina
UV	- Luz ultravioleta, aqui correspondendo ao comprimento de onda de 254 nm
XP	- xeroderma pigmentosum