

RESISTÊNCIA À MITOMICINA C EM E.coli K-12:  
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE MUTANTES.

ISOLDA DA FONSECA MUNGUBA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1983

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Isolda da Fonseca Munguba

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_\_

---

Aderson de Menezes Aquino  
Orientador da Dissertação

---

Maria da Guia Silva Lima

---

Iracema Lima Ainoz

A meus pais

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de Bolsa de Pós-Graduação concedida à autora.

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de Bolsa de Pós-Graduação (Demanda Social) concedida à autora.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi executada esta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos ao professor ADERSON DE MENEZES AQUINO, pela maneira como conduziu a orientação e por seu constante incentivo durante a realização deste trabalho.

Agradeço às professoras IRACEMA LIMA AINOUZ e MARIA DA GUIA SILVA LIMA, pelas sugestões apresentadas na elaboração desta dissertação.

Também agradeço aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo ambiente de cooperação e estímulo.

Sou grata ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela ajuda financeira que me proporcionou através de Bolsa de Pós-Graduação.

Finalmente agradeço aos meus pais pelo carinho, compreensão e estímulo que me proporcionaram e com isto, muito me ajudaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	ix
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	xi
<u>ABREVIATURAS</u> .....	xii
<u>RESUMO</u> .....	xiv
<u>ABSTRACT</u> .....	xvi
1 - <u>INTRODUÇÃO</u> .....	I
2 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u> .....	14
2.1 - <u>Reagentes Químicos</u> .....	14
2.2 - <u>Meios de Cultura</u> .....	14
2.3 - <u>Cepas Bacterianas</u> .....	15
2.4 - <u>Determinação da Tolerância Máxima à Mitomicina C</u> .....	17
2.5 - <u>Isolamento de Mutantes Resistentes à Mitomicina C</u> .....	17
2.6 - <u>Curvas de Crescimento dos Mutantes Resistentes à Mitomicina C e das Células Controle</u> .....	18
2.7 - <u>Resposta dos Mutantes Resistentes à Mitomicina C e das Células Controle a Agentes Químicos e Físicos</u> .....	18
2.7.1 - <u>Mitomicina C</u> .....	18
2.7.2 - <u>Ultravioleta</u> .....	19
2.7.3 - <u>Ácido Nitroso</u> .....	19
2.7.4 - <u>Nitrosoguanidina</u> .....	20
2.7.5 - <u>Calor</u> .....	20

2.7.6 - Ácido Nalidíxico .....	21
2.8 - <u>Determinação das Frequências de Mutação Espontânea nos Mutantes Residentes à Mitomicina C e nas Células Controle</u> .....	21
2.9 - <u>Determinação da Mutabilidade Induzida nos Mutantes Residentes à Mitomicina C e nas Células Controle</u> .....	22
2.9.1 - Ultravioleta .....	22
2.9.2 - Mitomicina C .....	23
3 - <u>RESULTADOS</u> .....	25
3.1 - <u>Isolamento de Mutantes Residentes à Mitomicina C</u> .....	25
3.2 - <u>Curvas de Crescimento dos Mutantes Residentes à Mitomicina C e das Células Controle</u> .....	25
3.3 - <u>Resposta dos Mutantes Residentes à Mitomicina C e das Células Controle a Agentes Químicos e Físicos</u> .....	31
3.3.1 - Mitomicina C .....	31
3.3.2 - Ultravioleta .....	31
3.3.3 - Ácido Nitroso .....	38
3.3.4 - Nitrosoguanidina .....	38
3.3.5 - Calor .....	45
3.3.6 - Ácido Nalidíxico .....	45
3.4 - <u>Frequências de Mutação Espontânea nos Mutantes Residentes à Mitomicina C e nas Células Controle</u> .....	45
3.5 - <u>Mutabilidade Induzida por Ultravioleta nos Mutantes Residentes à Mitomicina C e nas Células Controle</u> .....	50
3.6 - <u>Mutabilidade Induzida por Mitomicina C nos Mutantes Residentes à Mitomicina C e nas Células Controle</u> .....	50
4 - <u>DISCUSSÃO</u> .....	54

5 - <u>CONCLUSÕES</u> .....	62
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	64
7 - <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u> .....	75



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

### FIGURA

1	- Curva de crescimento dos clones AA201 e AA202 em "Penassay Broth" .....	27
2	- Curva de crescimento dos clones AA203 e AA204 em "Penassay Broth" .....	28
3	- Curva de crescimento dos clones AA205 e AA206 em "Penassay Broth" .....	29
4	- Curva de crescimento dos clones CSH57A e AA101 em "Penassay Broth" .....	30
5	- Resposta dos clones AA201, AA202 e dos controles CSH57A e AA101 à Mitomicina C .....	32
6	- Resposta dos clones AA203, AA204 e dos controles CSH57A e AA101 à Mitomicina C .....	33
7	- Resposta dos clones AA205, AA206 e dos controles CSH57A e AA101 à Mitomicina C .....	34
8	- Resposta dos clones AA201, AA202 e dos controles CSH57A e AA101 à radiação Ultravioleta ..	35
9	- Resposta dos clones AA203, AA204 e dos controles CSH57A e AA101 à radiação Ultravioleta...	36
10	- Resposta dos clones AA205, AA206 e dos controles CSH75A e AA101 à radiação ultravioleta...	37
11	- Resposta dos clones AA201, AA202 e dos controles CSH57A e AA101 ao Ácido Nitroso .....	39
12	- Resposta dos clones AA203, AA204 e dos controles CSH57A e AA101 ao Ácido Nitroso .....	40

FIGURA	Página
13 - Resposta dos clones AA205, AA206 e dos contro <u>les</u> CSH57A e AA101 ao Ácido Nitroso .....	41
14 - Resposta dos clones AA201, AA202 e dos contro <u>les</u> CSH57A e AA101 a Nitrosoguanidina .....	42
15 - Resposta dos clones AA203, AA204 e dos contro <u>les</u> CSH57A e AA101 a Nitrosoguanidina .....	43
16 - Resposta dos clones AA205, AA206 e dos contro <u>les</u> CSH57A e AA101 a Nitrosoguanidina .....	44
17 - Resposta dos clones AA201, AA202 e dos contro <u>les</u> CSH57A e AA101 ao Calor .....	46
18 - Resposta dos clones AA203, AA204 e dos contro <u>les</u> CSH57A e AA101 ao Calor .....	47
19 - Resposta dos clones AA205, AA206 e dos contro <u>les</u> CSH57A e AA101 ao Calor .....	48

## LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 - Cepas bacterianas utilizadas no trabalho .....	16
2 - Tempos de duplicação das cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206 e dos controles CSH57A e AA101 .....	26
3 - Frequência de mutação espontânea nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206, CSH57A e AA101 .....	49
4 - Mutabilidade His <sup>-</sup> His <sup>+</sup> induzida por ultravioleta nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206, CSH57A e AA101 .....	51
5 - Mutabilidade His <sup>-</sup> His <sup>+</sup> induzida por Mitomicina C nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206, CSH57A e AA101 .....	52

## ABREVIATURAS

ATP	- Adenosina tri-fosfato
A-T	- Adenina-Timina
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
G-C	- Guanina-Citosina
g/l	- Grama por litro
J	- Joule
mm <sup>2</sup>	- Milímetro quadrado
M	- Molar
MC	- Mitomicina C
<i>mcr</i>	- Resistência à Mitomicina C (genotipo)
NTG	- Nitrosoguanidina
p/v	- Peso por volume
RNA	- Ácido Ribonucleico
r.p.m.	- Rotações por minuto
UV	- Ultravioleta
v/v	- Volume por volume

$\mu\text{g/l}$  - Micrograma por litro

$\mu\text{m}$  - Micrometro

Nomenclatura genética, símbolos de genotipo e fenotipos foram usados de acordo com MILLER(1972 e BACHMANN(1983).

## RESUMO

Mutantes de E.coli K-12, resistentes à Mitomicina C, derivados da cepa CSH57A, foram caracterizados em relação à sua sobrevivência à Mitomicina C, nitrosoguanidina, ácido nitroso, ácido nalidíxico, calor e ultravioleta, bem como à frequência de mutação espontânea e à mutabilidade induzida por ultravioleta e Mitomicina C. Tais estudos foram realizados objetivando a identificação de novos mutantes em relação aos mecanismos de reparo de DNA.

Em relação ao tratamento com Mitomicina C verificou-se que os mutantes AA201, AA202, AA203 e AA205 apresentaram acentuado aumento na resistência a este antibiótico, quando comparados à cepa CSH57A.

Dos quatro clones acentuadamente resistentes à Mitomicina C, três deles, AA201, AA202 e AA205, apresentaram também resistência acentuada à nitrosoguanidina, quando comparados ao CSH57A e AA101.

Quanto ao tratamento com ácido nitroso verificou-se que o clone AA204 é um pouco mais resistente que os controles CSH57A e AA101, enquanto que o clone AA206 é levemente mais sensível que os mesmos controles. Os clones AA201, AA202, AA203 e AA205 apresentaram o mesmo comportamento que os controles.

Com relação à resposta ao ácido nalidíxico, todos os mutantes isolados neste trabalho apresentaram a mesma sensibilidade que os controles CSH57A e AA101.

A resistência apresentada pelos mutantes ao tratamento com calor foi igual à do controle AA101, o qual apresentou uma sobrevivência maior do que CSH57A.

Em relação à sobrevivência ao tratamento com ultra-

violeta, em condições para minimizar a fotorreativação, verificou-se que o mutante que apresentou maior resistência à Mitomicina C (AA202) foi o que apresentou maior sensibilidade ao ultravioleta, enquanto que o mutante que apresentou maior sensibilidade à Mitomicina C (AA206) foi o que apresentou maior resistência ao ultravioleta, quando comparados aos controles CSH57A e AA101.

Em relação às frequências de mutações espontâneas para a reversão  $\text{Trp}^- \rightarrow \text{Trp}^+$ , não existem diferenças significativas entre os mutantes e controles. No entanto, para a reversão  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ , os resultados indicam que as frequências de mutação espontânea nos mutantes AA201 e AA202 são dez e quatro vezes respectivamente mais elevadas do que as de CSH57A e AA101.

Os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por ultravioleta, para todos os mutantes estudados, não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles CSH57A e AA101. Foram, entretanto, encontradas diferenças quando se comparou os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por ultravioleta com os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por Mitomicina C. Verificou-se que estes últimos são de uma a duas ordens de grandeza menores que os primeiros.

O comportamento dos mutantes indica que estes são mutantes originais e deve existir um mecanismo específico para o reparo das lesões provocadas por Mitomicina C, sugerindo também que as mesmas são reparadas com uma eficiência bem maior do que as lesões provocadas pelos outros agentes estudados.

## ABSTRACT

E.coli K-12 Mitomycin C resistant mutants derived from the strain CSH57A were characterized in relation to their survival to Mitomycin C, nitrosoguanidine, nitrous acid, nalidixic acid, heat and ultraviolet, as well as spontaneous mutation rates, and ultraviolet and Mitomycin C induced mutability. The purpose of the present study was the identification of mutants with original characteristics with respect to DNA repair mechanisms.

The treatment with Mitomycin C showed that the mutants AA201, AA202, AA203 and AA205 exhibited a marked increase in resistance to this antibiotic, when compared to CSH57A.

Among the four clones with increased resistance to Mitomycin C, three of them - AA201, AA202 and AA205 - also presented increased resistance to nitrosoguanidine, when compared to CSH57A and AA101.

Nitrous acid treatment showed that the mutant AA204 is a little more resistant than the controls CSH57A and AA101, while the mutant AA206 is slightly more sensitive than the same controls. The mutants AA201, AA202, AA203 and AA205 showed the same behavior as the controls.

Nalidixic acid response showed that all mutants isolated in this work presented the same sensitivity as the controls CSH57A and AA101.

The resistance of the mutants to heat treatment was similar to the control AA101, which exhibited a greater survival than CSH57A.

Concerning to the survival to ultraviolet treatment, under conditions to minimize photoreactivation, it was



found that the most resistant mutant to Mitomycin C (AA202) was the most sensitive to ultraviolet, while the most sensitive mutant to Mitomycin C (AA206) was the most resistant to ultraviolet, when compared to the controls CSH57A and AA101.

Significant differences in spontaneous mutation rates for the reversion  $\text{Trp}^- \rightarrow \text{Trp}^+$  between mutants and controls were not found. However, with respect to the  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  reversion, the results indicated that the spontaneous mutation rates of the mutants AA201 and AA202 are ten and four times higher, respectively, than that of CSH57A and AA101.

There are no significant differences in ultraviolet-induced  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  mutabilities between mutants and CSH57A. However, when the values of ultraviolet-induced and Mitomycin C-induced mutabilities for the  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  reversion were compared, it was found that the latter were one to two orders of magnitude smaller than the former.

The behavior of the mutants indicates that they are original ones and there must exist a specific mechanism for the repair of Mitomycin C-induced lesions, and that these lesions are repaired much more efficiently than the ones induced by the other agents studied.

## 1 - INTRODUÇÃO

O DNA nas células vivas está constantemente sujeito a alterações, tanto espontâneas como induzidas por agentes químicos e físicos. Mesmo assim, a frequência de mutações espontâneas é muito baixa. Hoje se sabe que isso é devido aos mecanismos de reparo de DNA, os quais são responsáveis pela manutenção da integridade da informação genética.

A maior parte do que hoje se conhece sobre os processos de reparo de DNA, essenciais à sobrevivência da célula, é resultado de estudos com a bactéria Escherichia coli, em virtude da facilidade com que se pode manipulá-la geneticamente e do pouco tempo necessário para se observar os resultados experimentais (HANAWALT et alii, 1982).

Em seres eucarióticos a maior parte das alterações do DNA é mutagênica e potencialmente carcinogênica. Nos seres humanos, por exemplo, há várias doenças que estão associadas com defeitos na capacidade das células de reparar certos tipos de danos físicos ou químicos no DNA. Entre estas podemos citar: xeroderma pigmentosum, ataxia telangiectásica e anemia de Fanconi (SETLOW, 1978).

Entre os agentes químicos que têm sido utilizados para induzir mutações encontra-se a Mitomicina C (IYER & SZYBALSKI, 1963), que é um potente antibiótico antitumor produzido pelo Streptomyces verticillatus e espécies relacionadas (KAPLAN & HURLEY, 1981). A Mitomicina C é um agente alquilante bifuncional que, ao interagir com o DNA, provoca a formação de adutos monofuncionais e bifuncionais (ligações cruzadas entre as fitas complementares de DNA) (IYER & SZYBALSKI, 1963).

IYER & SZYBALSKI (1964) observaram que a proporção de ligações cruzadas aumenta com o conteúdo G-C do DNA, sen

do os resíduos de guanina o principal sítio de ligação covalente da Mitomicina C. De acordo com WEAVER & TOMASZ (1982) o grupo 2-amino do resíduo de guanina é o sítio de ligação mais provável da Mitomicina C. Para se ter uma idéia geral da influência que as lesões provocadas pela Mitomicina C exercem sobre outras rotas de reparo de DNA, compararam-se as curvas de sobrevivência das cepas em estudo submetidas a outros agentes mutagênicos tais como: nitrosoguanidina, ácido nitroso, ácido nalidixico, calor e ultravioleta. Uma descrição do mecanismo de ação destes agentes é feita a seguir.

Nitrosoguanidina - Segundo E.A.ADELBERG et alii (1965) a N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina parecia ser o agente mutagênico mais potente já descoberto e, segundo ele, a desvantagem de seu uso era a alta probabilidade de cada célula sofrer mutação em mais de um sítio. Segundo MILLER (1972) este agente induz principalmente substituição de bases. Segundo CERDÁ-OLMEDO & HANAWALT (1968) o principal agente envolvido nos efeitos letal e mutagênico da nitrosoguanidina acima de pH 5,0 é o diazometano, um produto da decomposição da nitrosoguanidina, agindo provavelmente na metilação do DNA. A pH 5,0 o agente causador de danos é a própria nitrosoguanidina, provavelmente causando alterações ribossômicas, enquanto que a pH menor que 5,0 os danos são causados principalmente pelo ácido nitroso.

A nitrosoguanidina provoca mutações na forquilha de replicação do cromossomo com uma eficiência muito maior do que em qualquer outra região. Desta maneira, deve ocorrer um grande aumento na taxa de mutação para qualquer que seja o gen, no momento em que ele estiver se replicando. A desvantagem de seu uso, entretanto, está no fato de que ela induz mutações muito próximas (ligadas) numa alta frequência (SKLAR, 1978). Para eliminar essa desvantagem em E.coli K-12, SKLAR usou o cloranfenicol em doses maiores que 0,1 µg/ml o qual aumenta bastante a frequência de mutação induzida por NTG. Este tratamento não aumenta as mutações de segundo sítio nem muda a frequência de mutação espontânea, provocan-

do apenas uma leve redução na sobrevivência das células.

Ácido Nitroso - O ácido nitroso produz a desaminação oxidativa das aminas primárias convertendo grupos-amina em grupos-hidroxila e reage com os ácidos nucleicos convertendo citosina em uracil, hidroximetil citosina em 5-hidroximetil uracil, adenina em hipoxantina e guanina em xantina. Segundo ZIMMERMANN (1977) citosina e adenina desaminadas são a principal causa de mutações puntiformes, enquanto que a desaminação da guanina não apenas produz xantina, mas provavelmente também causa a formação de pontes entre cadeias.

Mutantes ung<sup>-</sup>, que não possuem a enzima uracil-DNA glicosidase, são acentuadamente sensíveis ao tratamento com ácido nitroso, conforme ficou demonstrado por DA ROZA et alii (1977). DUNCAN et alii (1978) mostraram que os mutantes ung<sup>-</sup> de E.coli exibem frequências de mutação espontânea aumentadas, com a maior parte dessas mutações consistindo de transição G.C.—A.T (KARRAN & LINDAHL, 1980). Isso vem provar que a desaminação de citosina no DNA ocorre a uma taxa significativa in vivo e que estas lesões permanecem sem reparo em cepas ung<sup>-</sup> (KARRAN & LINDAHL, 1980).

Ácido Nalidíxico - Um dos efeitos principais do ácido nalidíxico é a inibição da síntese de DNA, sem no entanto interferir na síntese de RNA, conforme ficou demonstrado por W.A. GOSS et alii (1965). O ácido nalidíxico afeta todos os sistemas de replicação de DNA bacteriano e de organelas celulares de eucarióticos (CANOSI et alii, 1977).

A ação do ácido nalidíxico no bloqueio da síntese de DNA se faz através da inibição da DNA girase (GELLERT et alii, 1976), a qual catalisa as seguintes reações: 1) superenrolamento negativo de DNA circular de fita dupla dependente de ATP; 2) relaxamento de DNA superenrolado na ausência de ATP; 3) introdução de quebras de fita dupla de DNA em locais específicos promovidas por ácido oxolínico; 4) hidrólise de ATP dependente de DNA; 5) formação e separação

de DNA catenado de fita dupla e introdução e remoção de  $\text{n}\bar{\text{o}}$  em DNA circular de fita dupla. (COZZARELLI, 1980).

O estado superelicoïdal do DNA  $\bar{\text{e}}$  requerido para algumas funções, tais como replicação in vitro do DNA de dupla fita do  $\phi\text{X174}$  (MARIANS et alii, 1977) e s̄ntese de RNA, ocorrendo um aumento na freqüência de iniciação de transcriçãõ com um aumento no estado superelicoïdal do DNA (FAIRWEATHER et alii, 1980).

A DNA girase de E.coli  $\bar{\text{e}}$  composta de duas subunidades, A e B, que parecem funcionar em etapas diferentes na reaçaõ de superenrolamento: a subunidade A (homod̄mero, segundo YAMAGISHI et alii, 1981, e GELLERT 1981)  $\bar{\text{e}}$  responsãvel pelas atividades de quebra e reuniãõ, enquanto que a subunidade B (tambẽm um homod̄mero, segundo GÓMEZ-EICHELMANN, 1981) estã envolvida na associaçaõ a ATP, na etapa que envolve transferẽncia de energia (FAIRWEATHER et alii, 1980). KLEVAN & WANG(1980) mostraram que a DNA girase existe como um complexo  $\alpha_2\beta_2$ .

A DNA girase pertence  $\bar{\text{a}}$  classe de enzimas conhecidas como topoisomerases. Segundo GELLERT (1981) as topoisomerases catalizam tanto o desenrolamento do DNA superelicoïdal (enzimas desenroladoras), como a conversãõ de DNA circular relaxado  $\bar{\text{a}}$  forma superelicoïdal (DNA girase). As topoisomerases tambẽm podem catalisar a interconversãõ de outros isõmeros topolõgicos do DNA. Para essas interconversões sãõ requeridas a quebra transitõria e a reuniãõ de fitas de DNA, como ficou demonstrado por MIZUUCHI et alii (1980).

Calor - Radiações ionizantes produzem quebras de fitas simples, as quais tambẽm sãõ produzidas quando as cẽlulas sãõ expostas ao calor brando, como resultado da hidrõlise direta da ligaçaõ do fosfodiẽster, hidrõlise apõs despurinaçaõ (GREER & ZAMENHOF, 1962) ou indiretamente como resultado do ataque por endonucleases (BRIDGES et alii, 1969). Essas quebras de fitas simples jã haviam sido evidenciadas em 1966 por MCGRATH & WILLIAMS no DNA de bactẽrias que haviam sido

incubadas a 52<sup>0</sup>C por vários minutos. Estes dois fatores - calor (52<sup>0</sup>C) e radiação ionizante - parecem, portanto, causar os mesmos efeitos no DNA (BRIDGES et alii, 1969). A sensibilidade de cepas sensíveis e outras resistentes à radiação ionizante foi comparada por BRIDGES et alii (1969) para observar como se comportavam em relação ao calor (52<sup>0</sup>C). De acordo com seus resultados cepas sensíveis à radiação eram também sensíveis ao calor, sugerindo então que os sistemas responsáveis pelo reparo de danos causados por radiação ionizante estão também envolvidos no reparo de danos causados pelo calor.

De acordo com estudos feitos por GRECZ & BHATARAKAMOL (1977) de sedimentação em gradiente alcalino de sacarose, o calor brando (50-60<sup>0</sup>C) proporciona um início para a quebra de fitas de DNA, sendo este processo bastante reduzido por inibidores enzimáticos, como HgCl<sub>2</sub> ou p-cloromercuribenzoato, adicionados antes do aquecimento. Isto evidencia que a quebra de DNA é devida à ação enzimática ao invés da ação do próprio calor. Estes mesmos autores conseguiram demonstrar que em um mutante de E.coli deficiente em endonuclease do ácido apurínico (BW2001), as quebras no DNA eram em número bem mais reduzido que na cepa selvagem. Isso os levou a concluir que a quebra endonucleolítica do DNA parece ser o primeiro passo na ocorrência de danos causados por calor.

Ultravioleta - Os danos causados por UV manifestam-se principalmente na formação de dímeros entre resíduos de pirimidina adjacentes. A formação dos dímeros distorce a estrutura do DNA duplex em virtude das duas bases não mais estarem ligadas apenas através do esqueleto fosfodiéster, e a sua presença inibe tanto a replicação como a transcrição. O grau de resistência à radiação ultravioleta varia conforme o organismo e depende da eficiência dos sistemas de reparo desse organismo.

Os dímeros de pirimidina podem ser monomerizados pelo sistema de fotorreativação, quando a enzima fotorreativa

dora se liga ao dímero no DNA e absorve um fóton na faixa de 300-500 nm (SUTHERLAND & HAUSRATH, 1979). Esta enzima já foi purificada e teve suas propriedades físicas e químicas estudadas (SNAPKA & SUTHERLAND, 1980). Segundo SUTHERLAND & HAUSRATH (1979), a enzima de fotorreativação em E.coli é codificada pelos gens phrA e phrB.

O reparo por excisão, que pode se processar em ausência de luz, remove os dímeros de pirimidina através de quatro atividades enzimáticas seqüenciadas, representadas pelo sistema uvr. Inicialmente um corte do lado 5' do dímero de pirimidina é introduzido na fita de DNA que contém o dímero, por uma endonuclease específica para UV; em seguida ocorre a excisão do segmento da fita simples de DNA contendo o dímero através da atividade exonucleásica 5' → 3' da DNA polimerase I; a reposição desse segmento pela atividade DNA polimerásica da DNA polimerase I (CHASE et alii, 1979) e finalmente a união das duas extremidades pela DNA-ligase. Em 1966 HOWARD-FLANDERS demonstrou que uma mutação em qualquer um dos três loci não-ligados, uvrA, B, C causa uma incapacidade em remover dímeros de pirimidina do DNA por este mecanismo.

LEVIN e colaboradores (1976) estudando Micrococcus radiophilus, um organismo bastante resistente à radiação UV e raios-X, encontraram que após uma dose de 5.000 ergs/mm<sup>2</sup> todos os dímeros são removidos num período equivalente a mais ou menos uma geração. Os autores sugeriram que a enorme resistência desse organismo é em parte devida a sua capacidade de manter um eficiente sistema de reparo por excisão, podendo também ser devida a uma eficiente coordenação do reparo por excisão e outros sistemas (LEVIN et alii, 1976).

A substituição dos nucleotídios que sofreram excisão ocorre através de um processo conhecido como "replicação de reparo". Neste processo, a replicação ocorre no genoma em vários pontos separados, de modo que a densidade das moléculas de DNA não sofre alteração quando se permite que essa replicação ocorra na presença de bromouracil marcado,

que é mais denso que a timina. Em virtude desse fato diz-se que a replicação normal de DNA ocorre por um processo semi-conservativo, no qual uma mudança no meio produz DNA de densidade intermediária.

Outro sistema responsável pelo reparo de danos causados por UV é o sistema rec, compreendido por 3 loci - recB e recC, intimamente ligados, e recA. Mutações neste sistema causam um aumento na sensibilidade aos raios X e irradiação ultravioleta (GANESAN et alii, 1978).

Uma diferença fundamental entre os sistemas uvr e rec é o fato de o reparo por excisão agir nos próprios dímeros que estão no DNA parental, enquanto que o reparo por recombinação age nos espaços deixados nas fitas-filhas, produzidos pela replicação de dímeros que não sofreram excisão.

As lesões provocadas pelos agentes químicos e físicos, anteriormente descritos, são removidas por diferentes mecanismos de reparo de DNA, os quais serão sumariamente apresentados.

Fotorreativação - Neste processo, a enzima de fotorreativação reconhece e associa-se ao dímero formado entre pirimidinas adjacentes pela radiação ultravioleta (220-300nm), monomerizando-o após absorção de um fóton na faixa de 310 a 440nm. Essa enzima é encontrada em várias espécies e está presente tanto em bactérias como em células humanas (RUPERT, 1975). A enzima de fotorreativação foi estudada com detalhe por SNAPKA & SUTHERLAND (1980) usando uma cepa de E.coli K-12 que apresentava níveis grandemente aumentados dessa enzima.

Reparo por excisão - As primeiras observações indicativas do mecanismo de reparo de DNA por excisão foram feitas por SETLOW & CARRIER (1964) assim como BOYCE & HOWARD-FLANDERS (1964). Estes pesquisadores evidenciaram a liberação de dímeros de piridiminas na porção ácido-solúvel do DNA de E.coli resistente à radiação ultravioleta. Estes estudos foram em seguida aprofundados por diversos pesquisadores, dan



do origem a um esquema detalhado do mecanismo molecular de reparo de DNA por excisão. No caso da remoção de um dímero de pirimidina formado por radiação ultravioleta, ocorre primeiramente o reconhecimento do dímero por uma DNA glicosilase, a qual cliva a ligação glicosídica entre a pirimidina do lado 5' do dímero e a desoxirribose à qual se encontra ligada e em seguida uma atividade endonucleásica cliva a ligação fosfodiéster do lado 3' ou 5' do açúcar do sítio apirimidínico resultante (HASELTINE et alii, 1980). Essas duas atividades enzimáticas podem ser exercidas pela mesma proteína, como foi observado por NAKABEPPU & SEKIGUCHI (1981), em células de E.coli infectadas com o fago T4, sendo o reconhecimento do dano no DNA a etapa velocidade-limitante do processo (GROSSMAN et alii, 1978). A segunda etapa do processo é a excisão exonucleolítica do dímero e do açúcar do sítio apirimidínico juntamente com alguns nucleotídios adjacentes a ele, a qual é realizada pelas atividades exonucleásicas 3'→5' e 5'→3' da DNA polimerase I em E.coli. Após a excisão ocorre a replicação de reparo catalisada por uma DNA polimerase. KELLY et alii (1970) observaram que estas duas últimas etapas podem ser realizadas simultaneamente pela mesma enzima, a DNA polimerase I de E.coli. Além da DNA polimerase I com suas atividades exonucleásicas 3'→5' e 5'→3' duas outras enzimas de E.coli podem remover dímeros seletivamente de DNA in vitro que sofreu incisão: a DNA polimerase III através de sua atividade exonucleásica 5'→3' (LIVINGSTON & RICHARDSON, 1975) e a exonuclease VII (CHASE & RICHARDSON, 1974). Na etapa de replicação de reparo a DNA polimerase I parece ser a principal enzima implicada, em virtude de ligar-se in vitro às lacunas produzidas pela atividade das endonucleases que têm especificidade por dímeros e também em virtude de ser encontrada em maior número na célula (400 moléculas) quando comparada com DNA polimerase II (40 moléculas) e DNA polimerase III (10 moléculas por célula) (KORNBERG, 1974). Finalmente, após a substituição da região danificada, as enzimas responsáveis dissociam-se do DNA deixando um espaço no lado 3' da região anteriormente

danificada, o qual é reconhecido pela DNA ligase, que catalisa a formação de uma ponte fosfodiéster entre as duas extremidades da fita de DNA (LEHMAN, 1974).

Reparo de pós-replicação - Esse mecanismo de reparo de DNA foi primeiramente proposto por RUPP & HOWARD-FLANDERS (1968) e RUPP et alii (1971) para explicar a sobrevivência de cepas de Escherichia coli deficientes em excisão, quando irradiadas com UV.

Para contornar os efeitos letais da formação dos dímeros de pirimidina, RUPP & HOWARD-FLANDERS (1968) propuseram um modelo alternativo de reparo de DNA. De acordo com este modelo, após a replicação do DNA contendo dímeros de pirimidina, espaços vazios (descontinuidades) são deixados na fita de DNA em posição oposta àquela ocupada pelos dímeros. Tais espaços são posteriormente preenchidos com a sequência correta de bases doada por outra fita idêntica de uma segunda molécula de DNA, presente na mesma célula, através de recombinação genética. Este sistema não remove a lesão original (dímero de pirimidina) a qual permanece na fita original de DNA (GANESAN, 1974), mas repara as lesões secundárias originadas durante a replicação do DNA danificado, reconstituindo uma cópia íntegra do cromossoma bacteriano. As lesões permanecem nas fitas originais indefinidamente, mas pouco a pouco seus efeitos deixam de ser significativos devido à diluição.

O reparo de pós replicação requer um gen funcional recA, o qual também é necessário para a recombinação genética.

Reparo SOS - O reparo SOS, ao contrário dos reparos por excisão e recombinação, é um processo em decorrência do qual resulta uma frequência de mutação induzida maior do que a normal, sendo por isto denominado de "sujeito a erro". Ele está incluído entre as "funções SOS", as quais constituem um grupo de respostas indutíveis em E.coli que parece ser coordenadamente regulado (WITKIN, 1976; HANAWALT et alii,

1979). Entre estas podemos citar: inibição da divisão celular, inibição da degradação de DNA pós-irradiado, mutagênese induzida, reativação de Weigle, indução de profago e filamentação. Estas respostas aparecem após tratamento da célula com luz ultravioleta e vários agentes mutagênicos, como irradiação X, ácido nalidixico e Mitomicina C (WITKIN, 1976).

Todas as respostas SOS dependem dos gens recA e lexA (WITKIN, 1976). Com a indução das respostas SOS há também o aumento na concentração intracelular da proteína X, que é o produto do gen recA (MC ENTEE, 1977). O modelo proposto por ROBERTS et alii (1978) postula que a proteína recA está presente em níveis constitutivos e que, após a indução, é convertida a uma forma que possui atividade proteásica, a qual inativa vários repressores, entre eles a proteína lexA, que por sua vez é repressora dos gens recA e lexA (LITTLE et alii, 1981). A clivagem proteolítica de repressores celulares e do profago causa a indução das funções que são reprimidas na ausência de danos no DNA (GOTTESMAN, 1981).

O modelo para explicar a mutagênese propõe que a replicação na presença das lesões é facilitada pela modificação de uma ou mais das DNA polimerases normais. A DNA polimerase modificada não pararia a síntese nos pontos onde houvesse um dímero, usando, pelo contrário, este como molde, o que resultaria em erros (mutações) (HANAWALT et alii, 1979; OLAGORTA, 1982).

Resposta Adaptativa - Este sistema de reparo livre de erro e indutível, foi descrito primeiramente por SAMSON & CAIRNS (1977). Eles observaram que células de E.coli que haviam sido expostas a doses sub-letais de agentes alquilantes apresentavam uma sobrevivência aumentada e uma frequência de mutação diminuída, quando colocadas em meio com altas concentrações de agentes alquilantes e quando comparadas com células não adaptadas.

De acordo com JEGGO et alii (1977) a resposta adaptativa difere do reparo SOS; a adaptação não leva à expres-

são das funções SOS e células incapazes de realizar o reparo SOS podem apresentar resposta adaptativa. Também de acordo com JEGGO et alii (1978) a polimerase I parece ser necessária à resposta adaptativa.

Ainda não se conhece a nível molecular, o mecanismo da resposta adaptativa, mas provavelmente envolve a participação de DNA glicosilases indutíveis ou de desmetilases. Estas últimas poderiam agir em guaninas metiladas na posição O-6 removendo os grupos metílicos sem produzir alterações no DNA. (OLAGORTA, 1982; SAMSON & SCHWARTZ, 1980; SCHENDEL & ROBINS, 1978).

#### Reparo de bases pareadas incorretamente "Mismatch repair"

Este sistema de reparo de DNA opera através da discriminação entre uma fita de DNA recentemente sintetizada, que pode conter erros de replicação, e a fita parental que serviu como molde (LINDAHL, 1982). Pensa-se que a base desta discriminação envolva a metilação do DNA, (RADMAN et alii, 1979), a qual ocorre pouco tempo após a replicação.

O DNA de E.coli contém duas bases naturalmente metiladas, a N<sup>6</sup>-metiladenina e a 5-metilcitosina. Os grupos metílicos destas duas bases são adicionados enzimaticamente a uma velocidade bastante baixa, sendo que apenas 1% dos resíduos de adenina e 0,4% dos resíduos de citosina são metilados (OLAGORTA, 1982). Devido a isto, as fitas recentemente sintetizadas são menos metiladas que as fitas parentais, conforme foi sugerido por MARINUS (1976). Bactérias que não possuem este tipo de reparo de DNA têm frequências de mutação grandemente aumentadas, como é o caso dos mutantes de E.coli dam, que são deficientes na metilação geral de adenina (MARINUS & MORRIS, 1973) a qual ocorre na sequência 5'GATC 3' (LACKS & GREENBERG, 1977). Neste caso, a DNA adenina metilase emprega S-adenosil metionina como doador de grupos metila.

Até o presente momento o mecanismo molecular deste sistema de reparo ainda não foi elucidado (LINDAHL, 1982).

### Reparo de DNA de Plasmídios

ROBERTS & STRIKE (1981), trabalhando com DNA do plasmídio NTP16 irradiado com ultravioleta, compararam as eficiências com as quais os processos de reparo "de escuro" em E.coli (excisão e pós-replicação) agem no DNA do plasmídio e do DNA bacteriano. Para isto usaram cepas de E.coli com mutações no gen recA, o qual é importante para o processo de pós-replicação, e nos gens uvrA<sup>+</sup>, uvrB<sup>+</sup> e uvrC<sup>+</sup>, os quais são importantes para os processos de excisão. De acordo com seus resultados, as rotas de reparo que agem em DNA de plasmídio danificado por UV são bastante diferentes das rotas de reparo que agem no DNA cromossômico da bactéria. O reparo de pós-replicação parece ser ineficiente em plasmídio e o reparo por excisão mostrou ser menos eficiente em DNA cromossômico. Um efeito importante foi observado com respeito à mutação no gen recB, o que sugere que seu produto exerça um papel fundamental nas rotas de reparo por excisão que agem no DNA de plasmídio. Posteriormente, estes mesmos autores (STRIKE & ROBERTS, 1982) testaram a influência que teria um plasmídio residente, não danificado e essencialmente homólogo (pLV9) sobre a sobrevivência do NTP16 irradiado por UV, quando introduzido em células mutantes de E.coli. De acordo com seus resultados, a presença do pLV9 resultou num aumento substancial da fração de moléculas NTP16 que sobreviveram. Para que ocorra esse aumento na sobrevivência são necessários os produtos dos gens uvrA<sup>+</sup> e uvrB<sup>+</sup> do hospedeiro, mas não o produto do gen recA<sup>+</sup> do hospedeiro. Baseados nestes resultados STRIKE & ROBERTS (1982) sugeriram a existência de um novo processo de reparo de DNA, o qual agiria sobre DNA de plasmídio. Alguns mecanismos possíveis foram considerados pelos autores, porém sem nenhuma evidência conclusiva.

### Reparo promovido por Plasmídio

Um tipo de reparo de DNA promovido pelo plasmídio pKM101 foi observado por GOZE & DEVORET (1979) em células de E.coli K-12. Os autores verificaram que o plasmídio pKM101 protegia a célula de E.coli de danos causados por UV, ocorrendo também essa proteção em células mutantes deficientes no reparo de DNA por excisão, desde que os produtos dos gens recA<sup>+</sup>, lexA<sup>+</sup> e uvrE<sup>+</sup> fossem disponíveis. Observaram também um aumento na sobrevivência dos fagos  $\lambda$  e S13 após irradiação por UV, assim como um aumento na frequência de mutação do fago  $\lambda$ . Segundo GOZE & DEVORET (1979) o fato da função recA ser requerida para o efeito protetor evidenciado pelo plasmídio pKM101, não significa que a ação do plasmídio imite os efeitos da indução recA. Uma evidência disto é o aumento na sobrevivência do fago  $\lambda$  e de mutantes bacterianos recAlexB30, irradiados por UV, incapazes de expressar as funções indutíveis para as quais é necessário o produto do gen recA. Isto indica que o reparo promovido pelo plasmídio pKM101 torna-se eficiente tão logo as funções constitutivas do gen recA possam ser expressas. GOZE & DEVORET (1979) sugeriram que o reparo promovido pelo plasmídio pKM101 é constitutivo e diferente do reparo SOS, embora aquele também se ja sujeito a erro e provoque um aumento na taxa de mutação. Este aumento na taxa de mutação é explicado pelos autores como sendo o resultado do reparo de lesões potencialmente letais, embora as seqüências não sejam necessariamente restauradas. As mutações observadas seriam então as "marcas" das lesões originais.

Em vista da importância do estudo dos mecanismos de reparo de DNA e com o objetivo de contribuir para um melhor conhecimento dos mesmos em E.coli K-12, procedemos ao isolamento de mutantes resistentes à Mitomicina C. Estes mutantes foram caracterizados fenotipicamente com o objetivo de identificar, dentre eles, novas mutações.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Reagentes Químicos

Foram utilizados os reagentes abaixo relacionados com as respectivas procedências:

- Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EE.UU.: Mitomicina C e Ácido Nalidíxico.
- Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.: N-metil-N'-nitro-N-nitroso - guanidina.
- Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.: "Bacto Agar", "Bacto Penassay Broth", "Bacto EMB Agar Base", "Bacto Yeast Extract", "Bacto Nutrient Broth" e "Bacto Tryptone".
- Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland Ohio, EE.UU.: Mitomicina C, L-prolina e L-arginina.
- E. Merck, Darmstadt, Alemanha Ocidental: vitamina B<sub>1</sub> (dicloreto de tiamina), L-leucina, DL-triptofano, DL-valina, L-metionina, hipoxantina, L(-) histidina, L(-) fenilalanina, L-isoleucina e estreptomicina.

Os demais reagentes foram todos de grau analítico.

### 2.2 - Meios de Cultura

O meio "Nutrient Broth Double Strenght" é constituído de 1,6% (p/v) de "Bacto Nutrient Broth". O meio "Penassay Broth" é constituído de 1,75% (p/v) de "Bacto

Penassay Broth". O meio "Penassay Agar" é constituído do meio "Penassay Broth" solidificado com 1,5% (p/v) de "Bacto Agar".

"Luria Agar" é constituído de: "Bacto Tryptone" 1% (p/v); "Bacto Yeast Extract" 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v); "Bacto Agar" 1% (p/v). As placas "Penassay Agar" contendo Mitomicina C ou ácido nalidixico foram preparadas misturando-se um volume apropriado de uma solução "stock" de Mitomicina C ou ácido nalidixico a um volume adequado do meio "Penassay Agar" estéril, mantido líquido a uma temperatura de 52°C. Após a distribuição dos meios nas placas de Petri as mesmas são deixadas solidificar no escuro, à temperatura ambiente (25°C).

As placas para testar a capacidade de utilização de açúcares foram preparadas com 2,75% (p/v) de "EMB Agar Base", 0,5% (p/v) de "Yeast Extract" e 1,5% (p/v) de malto-se ou 1,0% (p/v) de qualquer outro açúcar a ser testado.

O meio "Spizizen", preparado conforme SPIZIZEN(1958), apresenta a seguinte composição: sulfato de amônio 0,2% (p/v); fosfato de potássio dibásico 1,4% (p/v); fosfato de potássio monobásico 0,6% (p/v); citrato trissódico dihidratado 0,1% (p/v) e sulfato de magnésio hepta-dihidratado 0,02% (p/v). O meio mínimo "Spizizen Agar" foi preparado acrescentando-se 2% (p/v) de "Bacto Agar" ao meio "Spizizen".

Os testes de caracterização fenotípica foram feitos em "Spizizen Agar" acrescidos de 0,5% (p/v) de glucose e dos constituintes apropriados nas seguintes concentrações: vitamina B<sub>1</sub> 500 µg/l; L-Leu, L-His, L-Ile, L-Val e L-Met 50 µg/l; L-Pro e L-Arg 200 mg/l; L-Trp 25 mg/l e Hyx 40 mg/l; estreptomicina 100 µg/ml.

### 2.3 - Cepas Bacterianas

A caracterização fenotípica de todas as cepas usadas neste trabalho e descritas na TABELA 1 foi feita usan-



TABELA 1 - Cepas bacterianas utilizadas (\*)

Cepa	Fenótipo
CSH57A	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>s</sup> .
AA101	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>r</sup> .
CSH64	Leu <sup>+</sup> , Pro <sup>+</sup> , Hyx <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> , His <sup>+</sup> , Arg <sup>+</sup> , Ile <sup>+</sup> , Met <sup>+</sup> , Str <sup>s</sup> , Ara <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup> , Mal <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>+</sup> , Xyl <sup>+</sup> , Mcr <sup>s</sup> .
AA201	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>r</sup> .
AA202	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>r</sup> .
AA203	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>r</sup> .
AA204	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>r</sup> .
AA205	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>r</sup> .
AA206	Leu <sup>-</sup> , Pro <sup>-</sup> , Hyx <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Ara <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Xyl <sup>-</sup> , Mcr <sup>r</sup> .

(\*) Todas as cepas bacterianas utilizadas são derivadas de E.coli K-12.

do-se a técnica de "replica plating" descrita por MILLER (1972).

#### 2.4 - Determinação da tolerância máxima à Mitomicina C

Com a finalidade de determinar a menor concentração de Mitomicina C capaz de inibir completamente o crescimento da cepa CSH57A em placas de "Penassay Agar", foi preparada uma "Master Plate" a partir de colônias isoladas das cepas CSH57A, CSH64 e AA101. Após incubação da "Master Plate" a 37°C por 18 horas, a mesma foi replicada (técnica de "replica plating", de acordo com MILLER (1972) em placas de "Penassay Agar" contendo Mitomicina C nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µg/ml. Os resultados foram analisados após 48 horas de incubação das réplicas a 37°C.

#### 2.5 - Isolamento de mutantes resistentes à Mitomicina C

Uma cultura de 18 horas de CSH57A foi diluída 1:100 (v/v) em "Penassay Broth" e mantida sob agitação a 37°C até atingir aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml. As células foram colhidas em filtro Millipore de poros de 0,45 µm de diâmetro, lavadas com igual volume de tampão fosfato 0,067M pH 7,0 e ressuspensas no mesmo tampão, mantendo-se a mesma densidade de células. Em seguida as células foram tratadas por 1 µg/ml de Mitomicina C durante 35 minutos, sob agitação, a 37°C, no escuro. Após esse tratamento as células foram novamente colhidas em filtro Millipore de poros de 0,45 µm de diâmetro, lavadas no mesmo volume de tampão fosfato 0,067M pH 7,0, ressuspensas no mesmo volume de "Penassay Broth" e incubadas por 2 horas sob agitação a 37°C. Em seguida alíquotas de 0,2 ml das suspensões celulares foram plaqueadas em "Penassay Agar" contendo 10 µg/ml de Mitomicina C a fim de selecionar os possíveis mutantes resistentes ao antibiô-

tico. A frequência de mutação foi calculada pela determinação da relação entre o número de mutantes isolados e o número de sobreviventes plaqueados.

## 2.6 - Curvas de Crescimento dos mutantes resistentes à Mitomicina C e das células controle.

Culturas de 18 horas das cepas a serem estudadas foram diluídas 1:50 (v/v) em "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a 37°C. A intervalos regulares a turbidez das culturas foi determinada em um colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro de 540 m $\mu$  e estes valores registrados com os respectivos tempos.

## 2.7 - Resposta dos mutantes resistentes à Mitomicina C e das células controle a agentes químicos e físicos.

### 2.7.1 - Mitomicina C

Culturas de 18 horas das cepas a serem testadas foram diluídas 1:100 (v/v) em "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a 37°C até atingirem aproximadamente a densidade de  $2 \times 10^8$  células/ml (leitura de 75 unidades no colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro de 540 m $\mu$ ). As células foram colhidas em filtro Millipore de poros de 0,45  $\mu$ m de diâmetro, lavadas com igual volume de tampão fosfato 0,067M pH 7,0 e ressuspensas no mesmo volume do mesmo tampão. Aliquotas em diluições apropriadas foram plaqueadas em "Penassay Agar" para determinação de viabilidade após incubação a 37°C no escuro durante a noite. Ao restante das suspensões celulares foi adicionada a Mitomicina C de modo a resultar numa concentração final de 1  $\mu$ g/ml, mantido sob agitação a 37°C e amostras foram tomadas para determinação da viabilidade a intervalos indicados nas figuras correspondentes.

### 2.7.2 - Ultravioleta

Culturas de 18 horas das cepas a serem testadas foram diluídas 1:100 (v/v) em "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a 37°C até atingirem aproximadamente a densidade de  $2 \times 10^8$  células/ml (leitura de 75 unidades no colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro de 540 m $\mu$ ). As células foram colhidas em filtro Millipore de poros de 0,45  $\mu$ m de diâmetro, lavadas com igual volume de NaCl 0,85% (p/v) e ressuspendidas na mesma solução salina de modo a obter-se uma densidade celular de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml. Diluições apropriadas foram plaqueadas em "Penassay Agar" para determinação da viabilidade após incubação a 37°C durante a noite. O restante das suspensões celulares foi mantido em gelo. Amostras de 3 ml, colocadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro sob agitação rotativa à temperatura ambiente por 5 minutos, foram irradiadas com a dose de ultravioleta desejada, por uma lâmpada Mineralight modelo R-52, produzida pela Ultraviolet Products, Inc., San Gabriel, California, EE.UU. e que emite predominantemente radiação de 254 nm de comprimento de onda. A intensidade de irradiação da lâmpada foi calibrada com um medidor Black-Ray Modelo nº J225 produzido pela Ultraviolet Products, Inc., San Gabriel, California, EE.UU. Após a irradiação, amostras foram tomadas para determinação de viabilidade, tomando-se os cuidados de minimizar os efeitos de fotorreativação.

### 2.7.3 - Ácido Nitroso

Culturas de 18 horas das cepas a serem testadas foram diluídas 1:100 (v/v) em "Nutrient Broth Double Strenght" e mantidas sob agitação a 37°C até atingirem aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml (leitura de 75 unidades no colorímetro Klett-Summerson usando-se filtro de 540 m $\mu$ ). As células

foram colhidas em filtro Millipore, de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro e ressuspensas em "Nutrient Broth Double Strenght" de modo a obter-se uma densidade de  $1 \times 10^9$  células/ml. A seguir as células foram diluídas 1:10 (v/v) em ácido nítrico 10mM (preparado segundo DA ROZA, 1977) e incubadas à temperatura ambiente, sob agitação. A viabilidade foi determinada a intervalos regulares em amostras apropriadamente diluídas em tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,5, para parar a reação, as quais foram, em seguida, plaqueadas em "Penassay Agar" e incubadas a 37°C durante uma noite.

#### 2.7.4 - Nitrosoguanidina

Culturas de 18 horas das cepas a serem testadas foram diluídas 1:50 (v/v) em "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a 37°C até atingirem a densidade de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml (leitura de 75 unidades no colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro de 540 m $\mu$ ). As células foram colhidas em filtro Millipore, de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro, lavadas em igual volume de tampão tris-maléico 0,05M pH 6,0 e ressuspensas no mesmo volume do mesmo tampão. O tampão tris-maléico foi preparado de acordo com ADELBERG et alii (1965) e tem a seguinte composição:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g/l;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $5 \times 10^{-3}$  g/l;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $2,5 \times 10^{-4}$  g/l; ácido maléico 0,05 M e tris (hidroximetil) aminometano 0,05 M. Em seguida, as células foram tratadas com nitrosoguanidina 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sob agitação a 37°C, tendo a viabilidade sido determinada a intervalos regulares em amostras adequadamente diluídas, plaqueadas em "Penassay Agar", e incubadas por uma noite a 37°C.

#### 2.7.5 - Calor

Culturas de 18 horas das cepas a serem testadas fo-

ram diluídas 1:50 (v/v) em "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a 37°C até atingirem aproximadamente a densidade de  $2 \times 10^8$  células/ml (leitura de 75 unidades no colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro de 540 m $\mu$ ). As células foram colhidas em filtro Millipore de poros de 0,45  $\mu$ m de diâmetro, lavadas no mesmo volume de tampão fosfato 0,067 M pH 7,0 e ressuspensas no mesmo volume do mesmo tampão. Amostras de 2 ml foram colocadas em tubos de ensaio em posição inclinada e incubadas por diferentes, a 52°C sendo em seguida, diluídas em tampão fosfato 0,067 M pH 7,0 a 25°C. Para se determinar a viabilidade foram feitas diluições apropriadas, as quais foram plaqueadas em "Penassay Agar" e incubadas a 37°C por uma noite.

#### 2.7.6 - Ácido Nalidíxico

A partir de colônias isoladas das cepas a serem testadas foram preparadas "Master Plates" em "Penassay Agar" e após incubação a 37°C, por uma noite, as mesmas foram replicadas em "Luria Agar" contendo ácido nalidíxico nos níveis de 2, 4, 10 e 20  $\mu$ g/ml. Após incubação das réplicas a 37°C por uma noite, os resultados foram registrados.

#### 2.8 - Determinação das frequências de mutação espontânea nos mutantes resistentes à Mitomicina C e nas células controle.

Colônias isoladas das cepas a serem testadas foram integralmente transferidas para "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a 37°C por 17 horas. As células foram colhidas após centrifugação (3.000 r.p.m. em centrífuga FANEM, modelo 204-N 30 minutos), lavadas com o mesmo volume de NaCl 0,85% (p/v) e ressuspensas em um décimo do volume original de NaCl 0,85% (p/v). Aliquotas apropriadas foram plaqueadas

em "Spizizen Agar", suplementadas para testar separadamente a capacidade de produzir triptofano e histidina. Os resultados foram registrados após 48 horas de incubação a 37°C. Para se determinar a viabilidade foram feitas diluições apropriadas, as quais foram plaqueadas em "Penassay Agar" e incubadas a 37°C por uma noite.

Para calcular a frequência de mutação espontânea usou-se a seguinte equação (ZAMENHOF, 1969):

$$M = \frac{\pi - \pi_0}{\ln(p/p_0)}$$

$\pi_0$  - proporção inicial de mutantes

$\pi$  - proporção final de mutantes viáveis

$p_0$  - número inicial de células

$p$  - número final de células viáveis

## 2.9 - Determinação de mutabilidade induzida nos mutantes resistentes à Mitomicina C e nas células controle.

### 2.9.1 - Ultravioleta

Culturas de 18 horas das cepas a serem testadas foram diluídas 1:10 (v/v) em "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a 37°C até atingirem a densidade de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml (leitura de 75 unidades no colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro de 540 m $\mu$ ). As células foram colhidas após centrifugação (3.000 r.p.m. em centrífuga FANEM, modelo 204-N 30 minutos), lavadas no mesmo volume de tampão fosfato 0,067 M pH 7,0, ressuspensas no mesmo volume do mesmo tampão e mantidas em gelo. Amostras de 3 ml foram distribuídas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, mantidas sob agitação rotativa à temperatura ambiente por cinco minutos e em seguida foram irradiadas com uma

dose de ultravioleta de  $80 \text{ J/m}^2$  usando-se uma Mineralight Lamp, Model R-52, Ultra-Violet Products, Inc., San Gabriel, California, EE.UU., que emite predominantemente radiação de 254 nm de comprimento de onda. A intensidade de irradiação da lâmpada foi calibrada com um medidor de ultravioleta Black-Ray nº J225, produzido pela Ultra-Violet Products, Inc., San Gabriel, California, EE.UU.. A dose de irradiação utilizada reduz a viabilidade das cepas testadas para aproximadamente 10% da inicial. Em seguida, alíquotas apropriadas foram plaqueadas em "Spizizen Agar" suplementadas para testar a capacidade de produzir histidina. Os resultados foram registrados após 48 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ . Para se determinar a viabilidade foram feitas diluições apropriadas, as quais foram plaqueadas em "Penassay Agar" e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por uma noite. Ao longo de todos os experimentos foram tomados os cuidados para minimizar a fotorreativação. A mutabilidade foi calculada como a proporção entre o número de mutantes viáveis e o número de células viáveis após o tratamento indutor.

#### 2.9.2 - Mitomicina C

Culturas de 18 horas das cepas a serem testadas foram diluídas em "Penassay Broth" e mantidas sob agitação a  $37^\circ\text{C}$  até atingirem a densidade de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml (leitura de 75 unidades no colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro de 540 m $\mu$ ). As células foram colhidas após centrifugação (3.000 r.p.m. em centrífuga FANEM modelo 204-N, 30 minutos), lavadas no mesmo volume de tampão fosfato 0,067 M pH 7,0, ressuspensas no mesmo volume do mesmo tampão e tratadas por 1  $\mu\text{g/ml}$  e/ou 2  $\mu\text{g/ml}$  de Mitomicina C por 30 e/ou 45 minutos. Em cada caso, pelo menos um dos tratamentos reduz a viabilidade a 10% da inicial. Em seguida, alíquotas foram plaqueadas em "Spizizen Agar" e em "Spizizen Agar" contendo 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de histidina para testar a capacidade de produzir histidina. Os resultados foram re-



gistrados após 48 horas de incubação a 37<sup>0</sup>C. Para se determinar a viabilidade foram feitas diluições adequadas das suspensões celulares antes e depois de tratadas com Mitomicina C, as quais foram plaqueadas em "Penassay Agar" e incubadas a 37<sup>0</sup>C por uma noite.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Isolamento de mutantes resistentes à Mitomicina C.

Após o tratamento de CSH57A com 1 µg/ml de Mitomicina C em tampão fosfato 0,067 M pH 7,0 por 35 minutos, foi obtida uma sobrevivência de aproximadamente 10%. Cada uma das vinte placas de "Penassay Agar" contendo 10 µg/ml de Mitomicina C recebeu aproximadamente  $2,4 \times 10^6$  células viáveis. Após 48 horas de incubação a 37°C no escuro, observou-se o aparecimento de 6 clones resistentes à Mitomicina C, os quais foram isolados, purificados e denominados AA201, AA202, AA203, AA204, AA205 e AA206 (TABELA 1). As condições seletivas utilizadas foram estabelecidas através de determinação do nível máximo de tolerância à Mitomicina C das cepas CSH57A, CSH64 e AA101. Esta tolerância foi determinada após incubação das réplicas das referidas cepas a 37°C por 48 horas em "Penassay Agar" contendo níveis crescentes de Mitomicina C. Constatamos que operacionalmente CSH57A e CSH64, embora ainda mostrem vestígios de crescimento em presença de 8 µg/ml de Mitomicina C, este crescimento é completamente abolido por níveis iguais ou maiores do que 10 µg/ml. No entanto, mesmo em presença de 12 µg/ml de Mitomicina C, AA101 ainda cresce visivelmente.

Os seis mutantes isolados apresentaram a seguinte caracterização fenotípica: Leu<sup>-</sup>, Pro<sup>-</sup>, Hyx<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Arg<sup>-</sup>, Ile<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, Str<sup>r</sup>, Ara<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Mal<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, Xyl<sup>-</sup> e Mcr<sup>r</sup>.

#### 3.2 - Curvas de crescimento dos mutantes resistentes à Mitomicina C e das células controle.

As curvas de crescimento em "Penassay Broth" a 37°C

dos mutantes e dos controles são apresentadas nas FIGURAS 1 (AA201 e AA202), 2 (AA203 e AA204), 3 (AA205 e AA206) e 4 (CSH57A e AA101). A partir destas curvas de crescimento foi calculado o tempo de duplicação das respectivas cepas, durante a fase de crescimento exponencial. Os valores dos tempos de duplicação dos mutantes e dos controles se encontram na TABELA 2.

TABELA 2 - Tempos de duplicação das cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206 e dos controles CSH75A e AA101.

Cepa	Tempo de duplicação (min.)
AA201	39
AA202	41
AA203	37
AA204	37
AA205	37
AA206	37
CSH57A	35
AA101	36

Diante destes resultados podemos afirmar que os tempos de duplicação dos mutantes AA203, AA204, AA205 e AA206 são iguais aos dos controles CSH57A e AA101, enquanto que os mutantes AA201 e AA202 apresentam tempos de duplicação mais longos que os referidos controles.

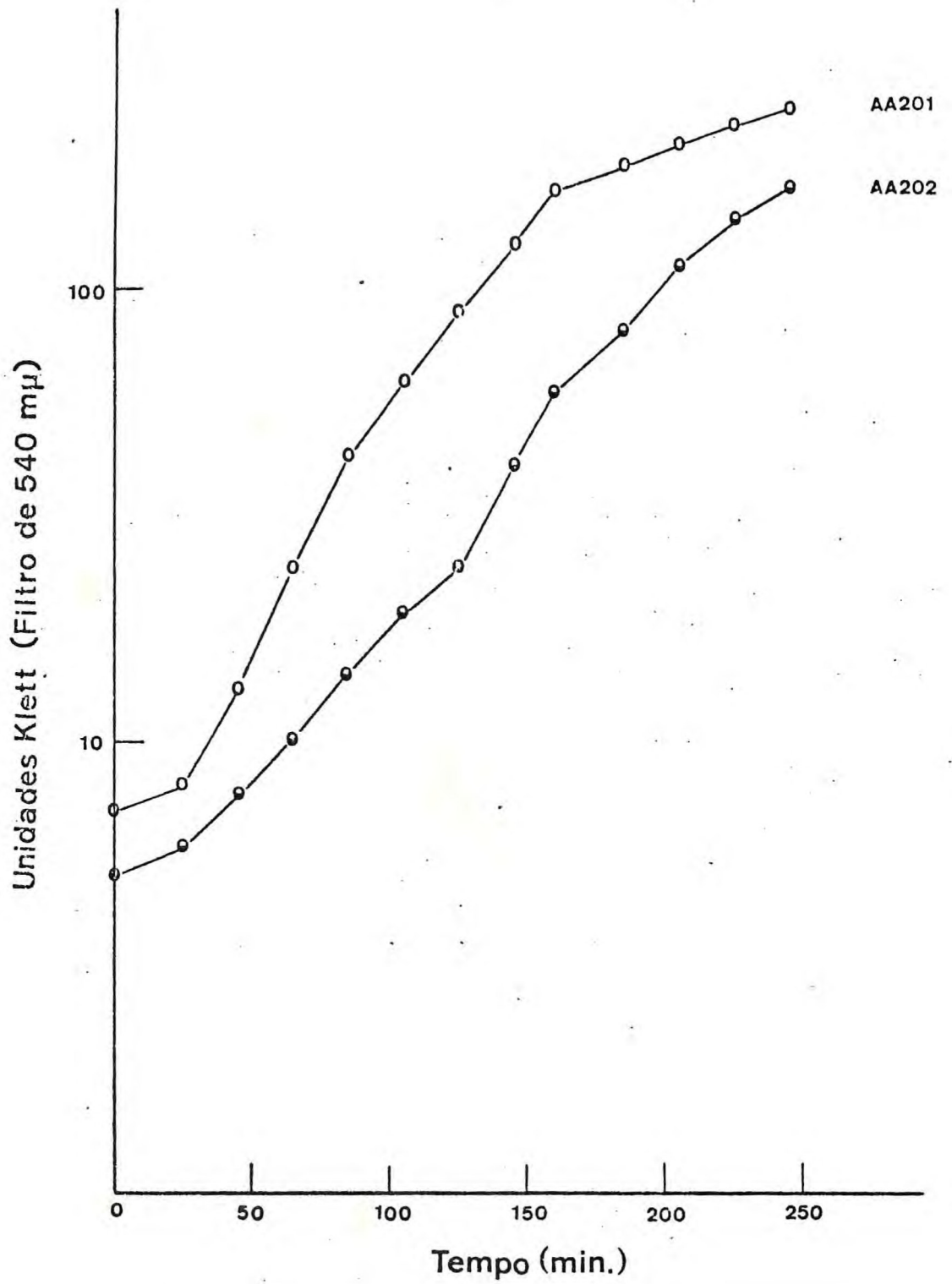


FIGURA 1 - Curvas de crescimento dos clones AA201 (○) e AA202 (●) em "Penassay Broth".

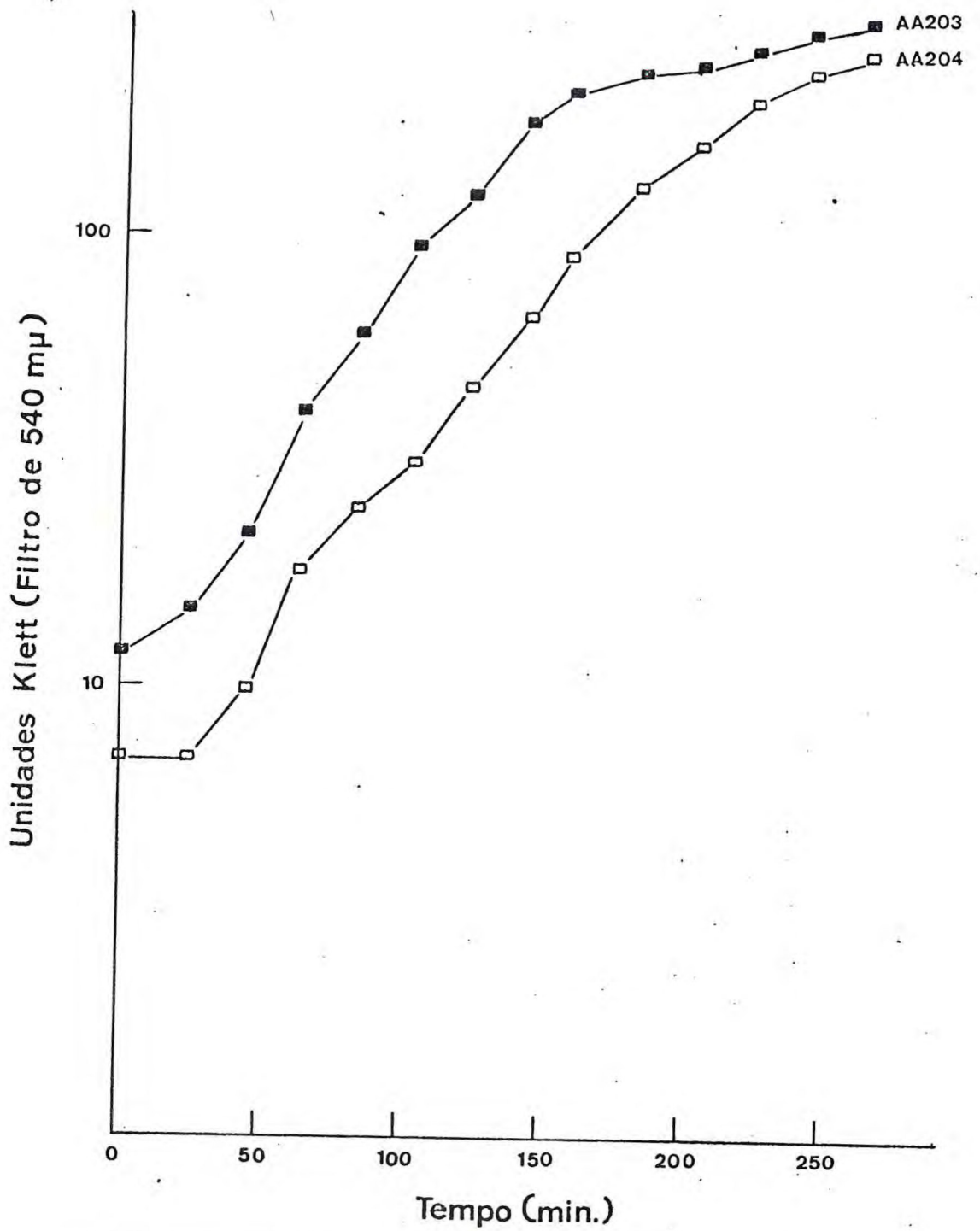


FIGURA 2 - Curvas de crescimento dos clones AA203 (■) e AA204 (□) em "Penassay Broth".

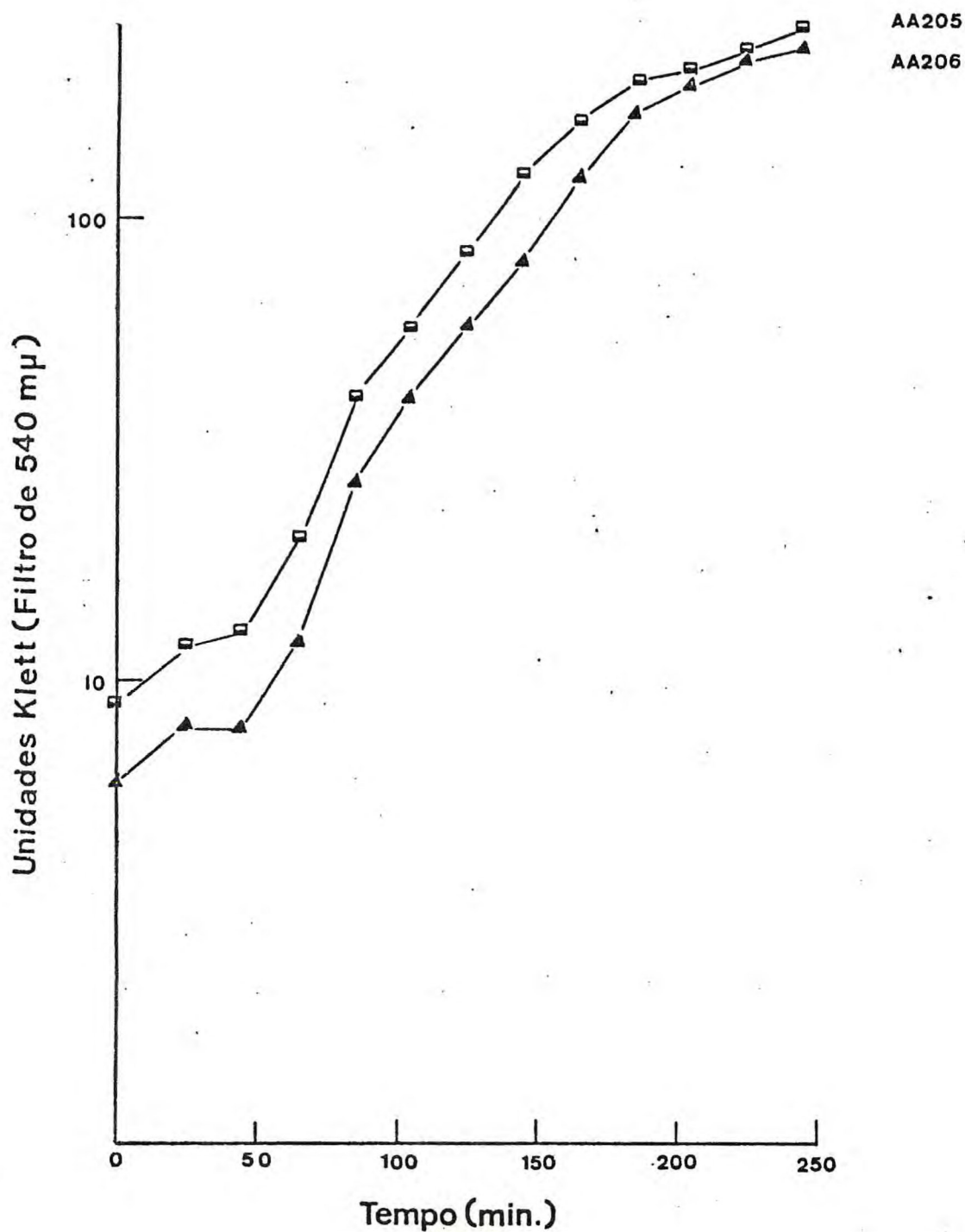


FIGURA 3 - Curvas de crescimento dos clones AA205 (■) e AA206 (▲) em "Penassay Broth".

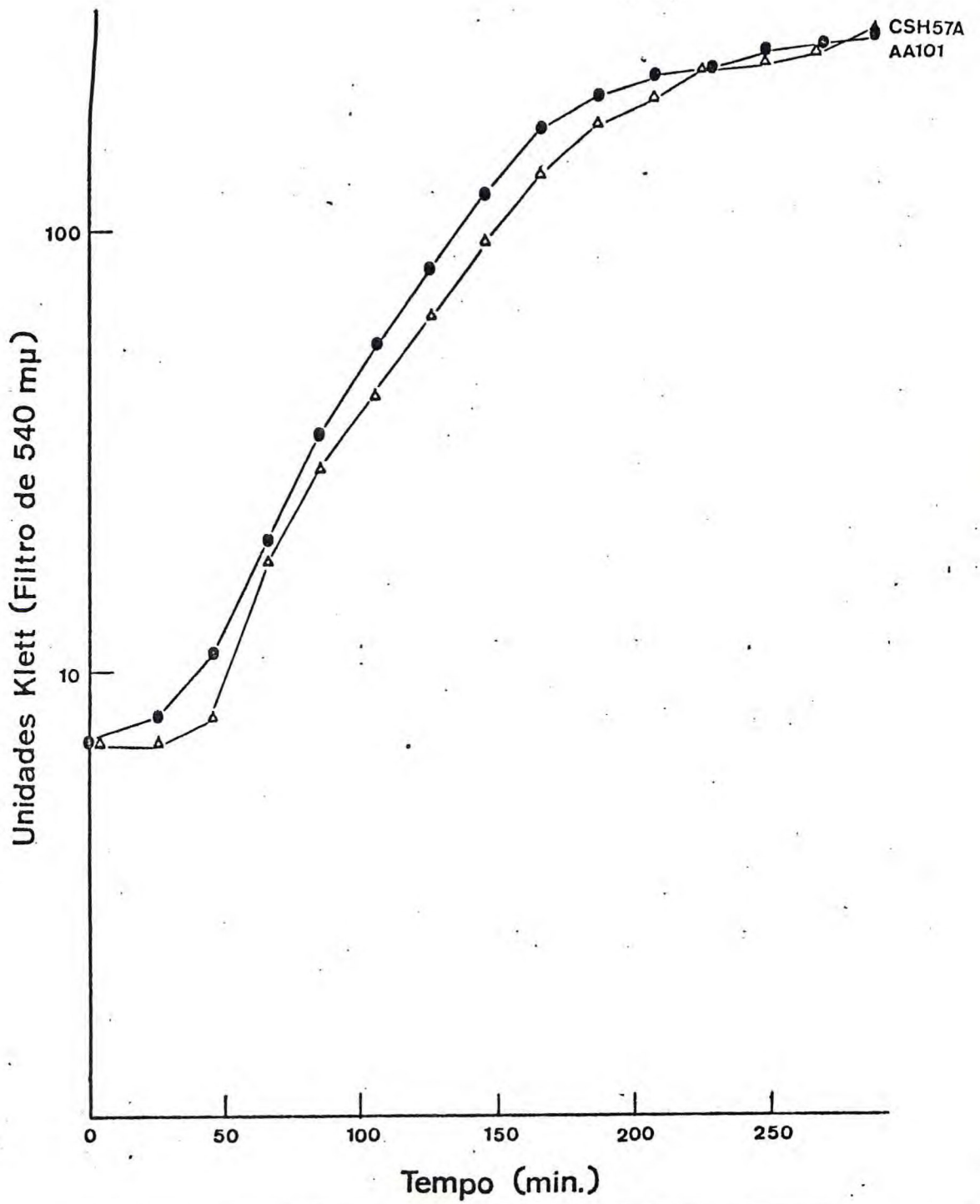


FIGURA 4 - Curvas de crescimento dos clones CSH57A (●) e AA101 (Δ) em "Penassay Broth".

### 3.3 - Resposta dos mutantes resistentes à Mitomicina C e das células controle a agentes químicos e físicos.

#### 3.3.1 - Mitomicina C

A sobrevivência dos seis clones selecionados em placas de "Penassay Agar" contendo 10 µg/ml e dos controles após tratamento por 1 µg/ml de Mitomicina C a 37°C por vários períodos de tempo é apresentada nas FIGURAS 5 (AA201, AA202, CSH57A e AA101), 6 (AA203, AA204, CSH57A e AA101) e 7 (AA205, AA206, CSH57A e AA101). Destes resultados podemos concluir que os clones AA201, AA202, AA203 e AA205 isolados neste trabalho são acentuadamente mais resistentes à Mitomicina C do que a cepa da qual são descendentes (CSH57A) e ligeiramente mais resistentes do que o controle AA101. O clone AA204 é um pouco mais resistente à Mitomicina C do que CSH57A e menos resistente do que o controle AA101, enquanto que AA206 é mais sensível do que ambos os controles. No caso de AA202, a sua sobrevivência após 90 minutos de tratamento por 1 µg/ml de Mitomicina C é 10<sup>3</sup> vezes mais elevada do que CSH57A, e aproximadamente 10 vezes mais elevada do que AA101.

#### 3.3.2 - Ultravioleta

A sobrevivência dos seis clones e dos controles selecionados em placas de "Penassay Agar" após terem sido expostos a diversas doses de irradiação ultravioleta e incubados a 37°C no escuro está apresentada nas FIGURAS 8 (AA201, AA202, CSH57A e AA101), 9 (AA203, AA204, CSH57A e AA101) e 10 (AA205, AA206, CSH57A e AA101). As cepas AA201, AA204, AA205, CSH57A e AA101 apresentam a mesma sensibilidade ao ultravioleta. A cepa AA202 pode ser considerada um pouco



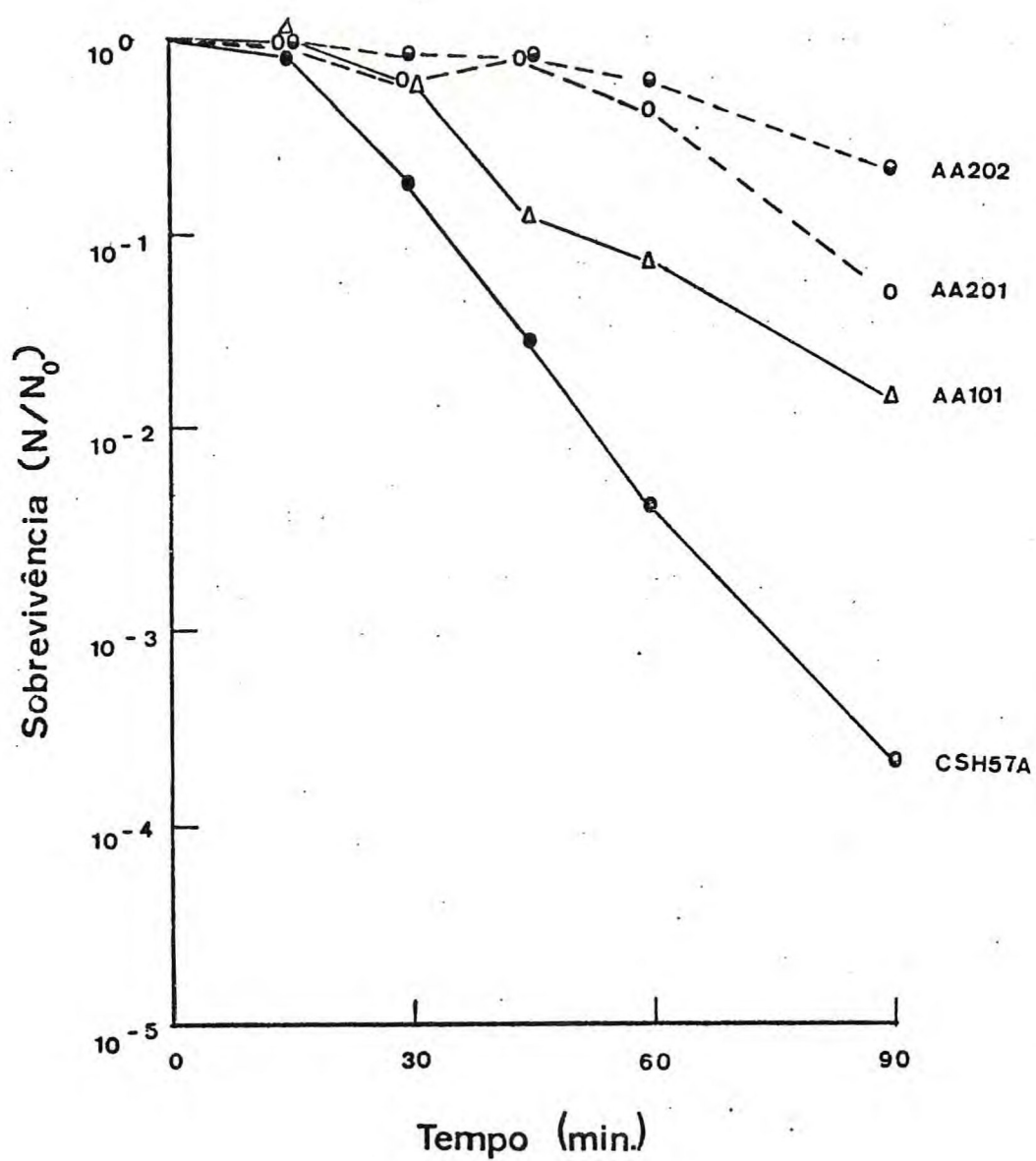


FIGURA 5 - Resposta dos clones AA201 (○ — — ○), AA202 (● — — ●) e dos controles CSH57A (● — — ●) e AA101 (△ — — △) à Mitomicina C (1,0 µg/ml).

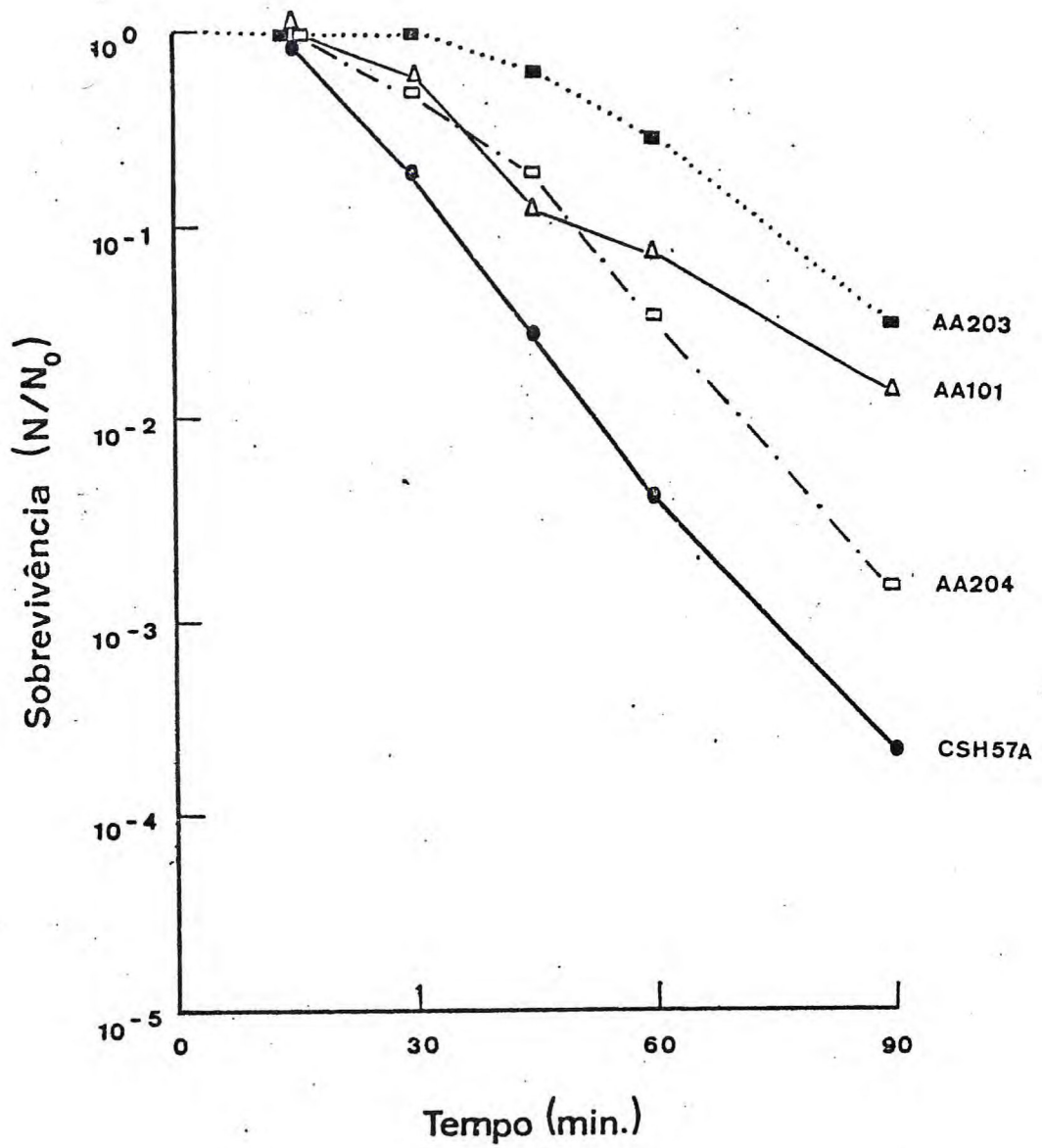


FIGURA 6 - Resposta dos clones AA203 (■.....■), AA204 (□-.-.-.□) e dos controles CSH57A (●——●) e AA101 (Δ——Δ) à Mitomicina C (1,0 µg/ml).

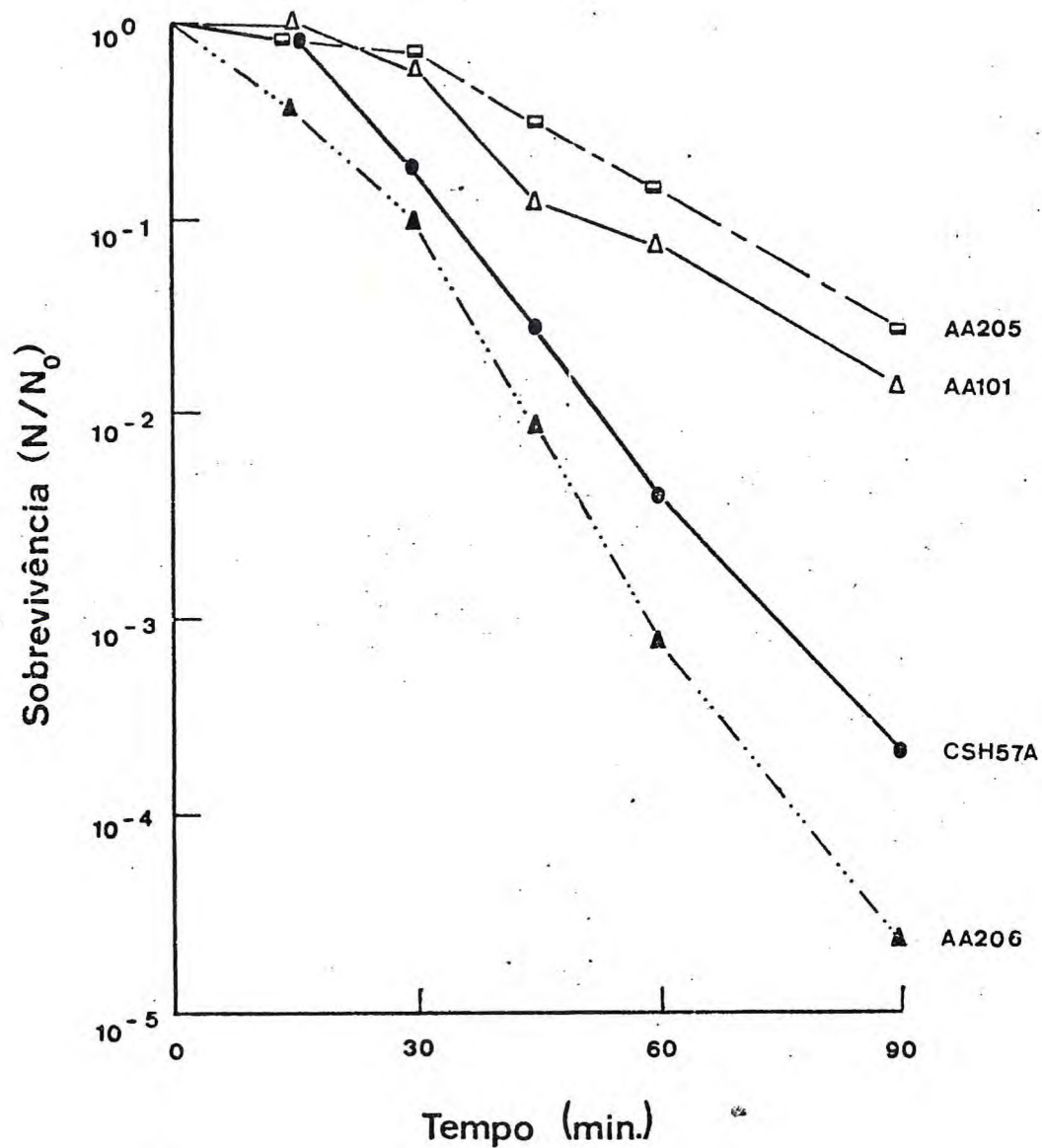


FIGURA 7 - Resposta dos clones AA205 (□ - - - □), AA206 (△ - · - · - △) e dos controles CSH57A (● - - - ●) e AA101 (△ - - - △) à Mitomicina C (1,0 µg/ml).

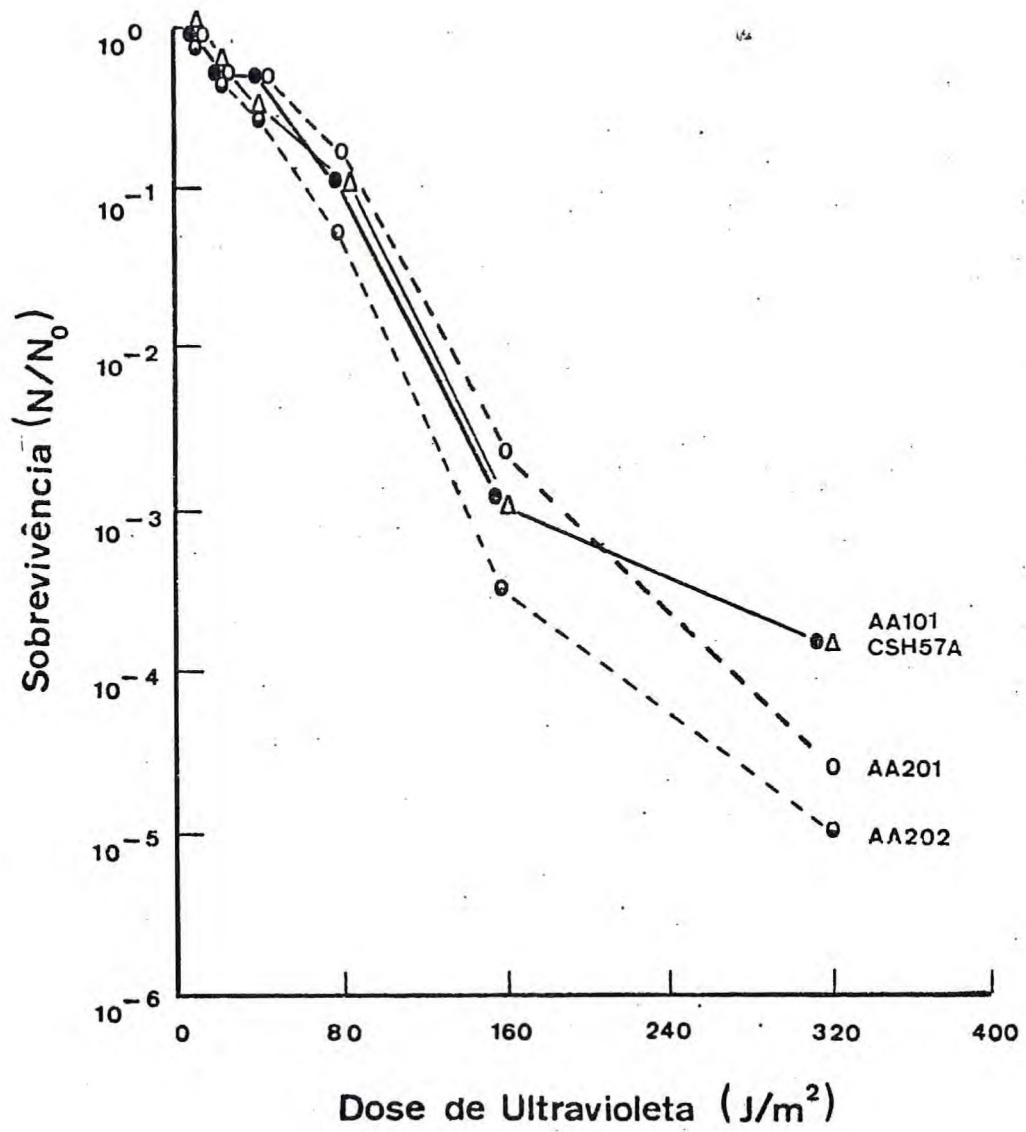


FIGURA 8 - Resposta dos clones AA201 (○ — — — ○), AA202 (● — — — ●) e dos controles CSH57A (● — — — ●) e AA101 (Δ — — — Δ) à radiação Ultravioleta.

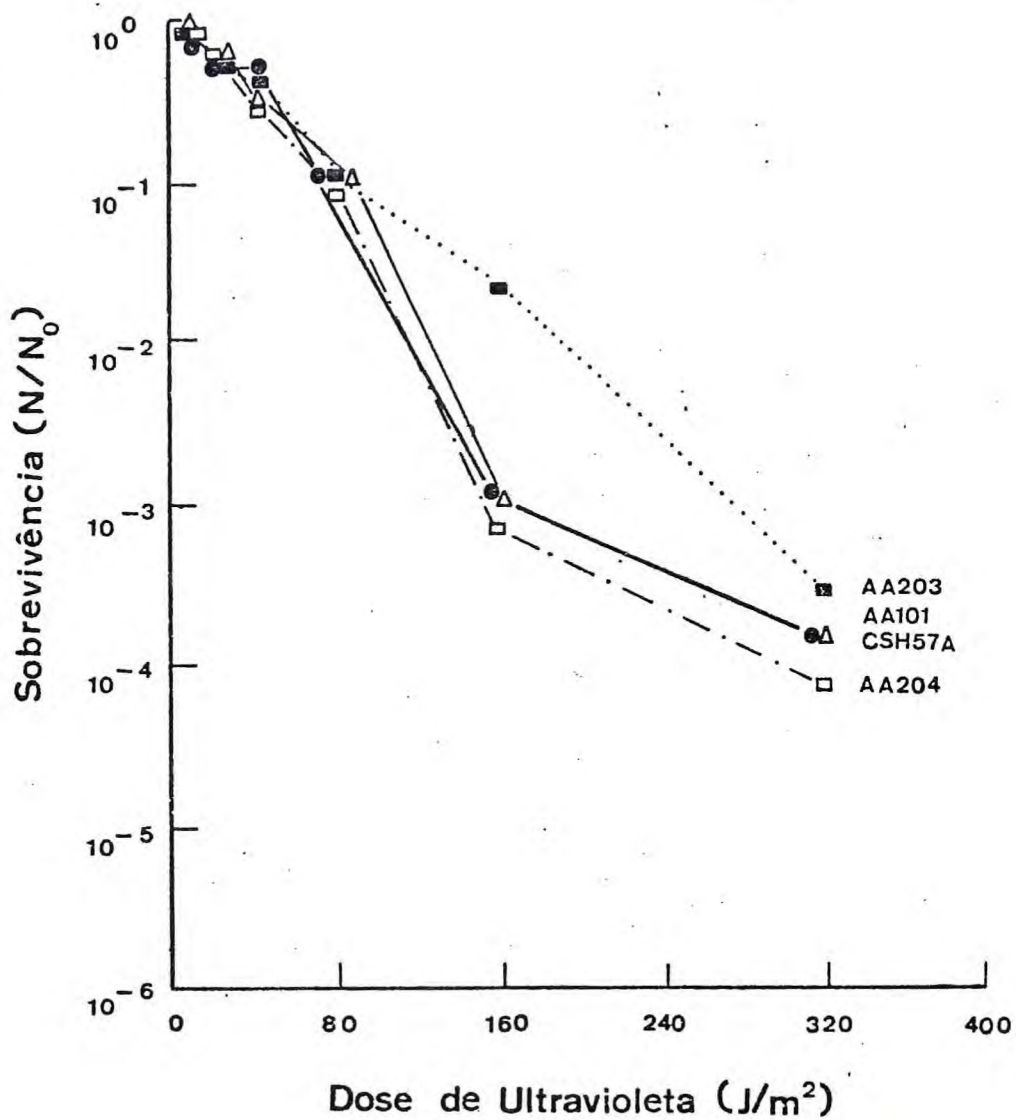


FIGURA 9 - Resposta dos clones AA203 (■.....■), AA204 (□——□) e dos controles CSH57A (●——●) e AA101 (Δ——Δ) à radiação Ultravioleta.

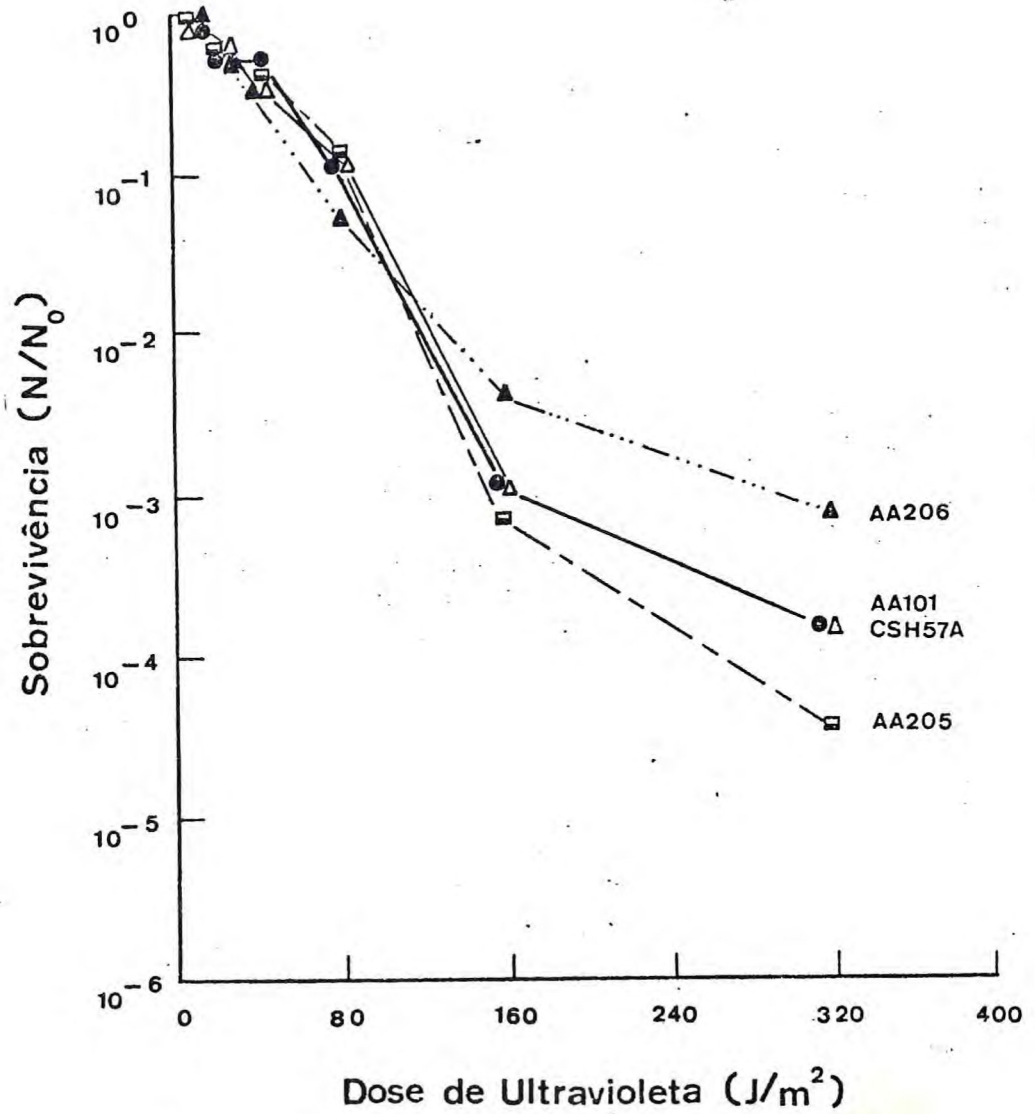


FIGURA 10 - Resposta dos clones AA205 (□— — □), AA206 (▲—... — ▲) e dos controles CSH57A (●— — ●) e AA101 (Δ— — Δ) à radiação Ultravioleta.

mais sensível do que os controles, enquanto que AA203 e AA206 são ligeiramente mais resistentes do que CSH57A e AA101.

### 3.3.3 - Ácido Nitroso

A sobrevivência dos seis clones selecionados e dos controles em "Penassay Agar" após terem sido expostos por diversos tempos a ácido nitroso 10 mM e incubados a 37°C está apresentada nas FIGURAS 11 (AA201, AA202, CSH57A e AA101), 12 (AA203, AA204, CSH57A e AA101) e 13 (AA205, AA206, CSH57A e AA101). As cepas AA201, AA202, AA203, AA205, CSH57A e AA101 apresentam a mesma sensibilidade ao ácido nitroso. A cepa AA204 é um pouco mais resistente do que as cepas CSH57A e AA101, enquanto que a cepa AA206 é levemente mais sensível que os controles.

### 3.3.4 - Nitrosoguanidina

A sobrevivência dos clones selecionados e dos controles em "Penassay Agar" após terem sido expostos por diversos tempos a 200 µg/ml de nitrosoguanidina e incubados a 37°C está representada nas FIGURAS 14 (AA201, AA202, CSH57A e AA101), 15 (AA203, AA204, CSH57A e AA101) e 16 (AA205, AA206, CSH57A e AA101). As cepas AA203 e AA206 apresentam a mesma sensibilidade a nitrosoguanidina que os controles. As cepas AA201 e AA202 são ligeiramente mais resistentes do que CSH57A e AA101. As cepas AA204 e AA205 são um pouco mais resistentes do que AA201 e AA202.

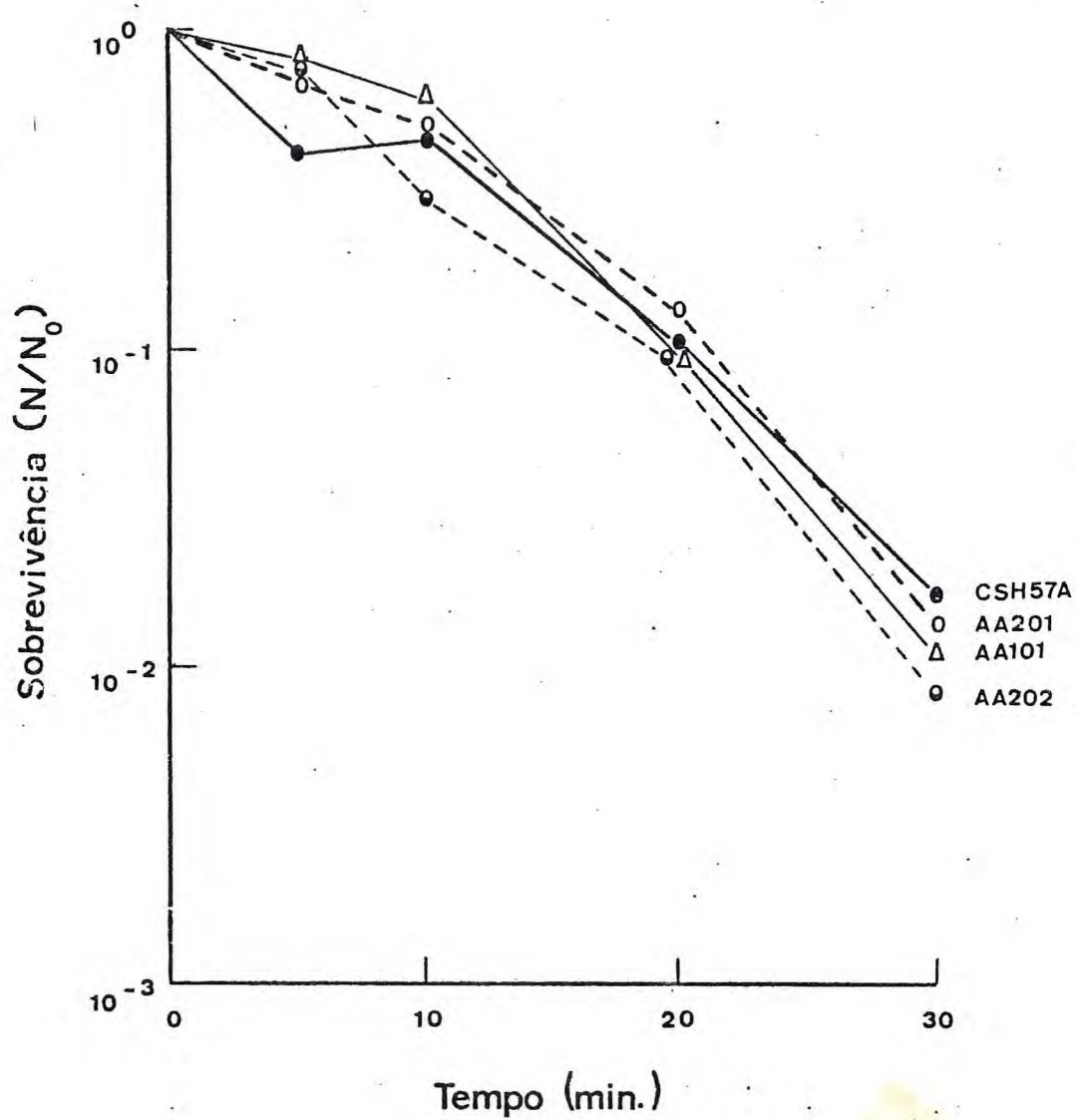


FIGURA 11 - Resposta dos clones AA201 (○- - -○), AA202 (●- - -●) e dos controles CSH57A (●—●) e AA101 (△—△) ao Ácido Nitroso.



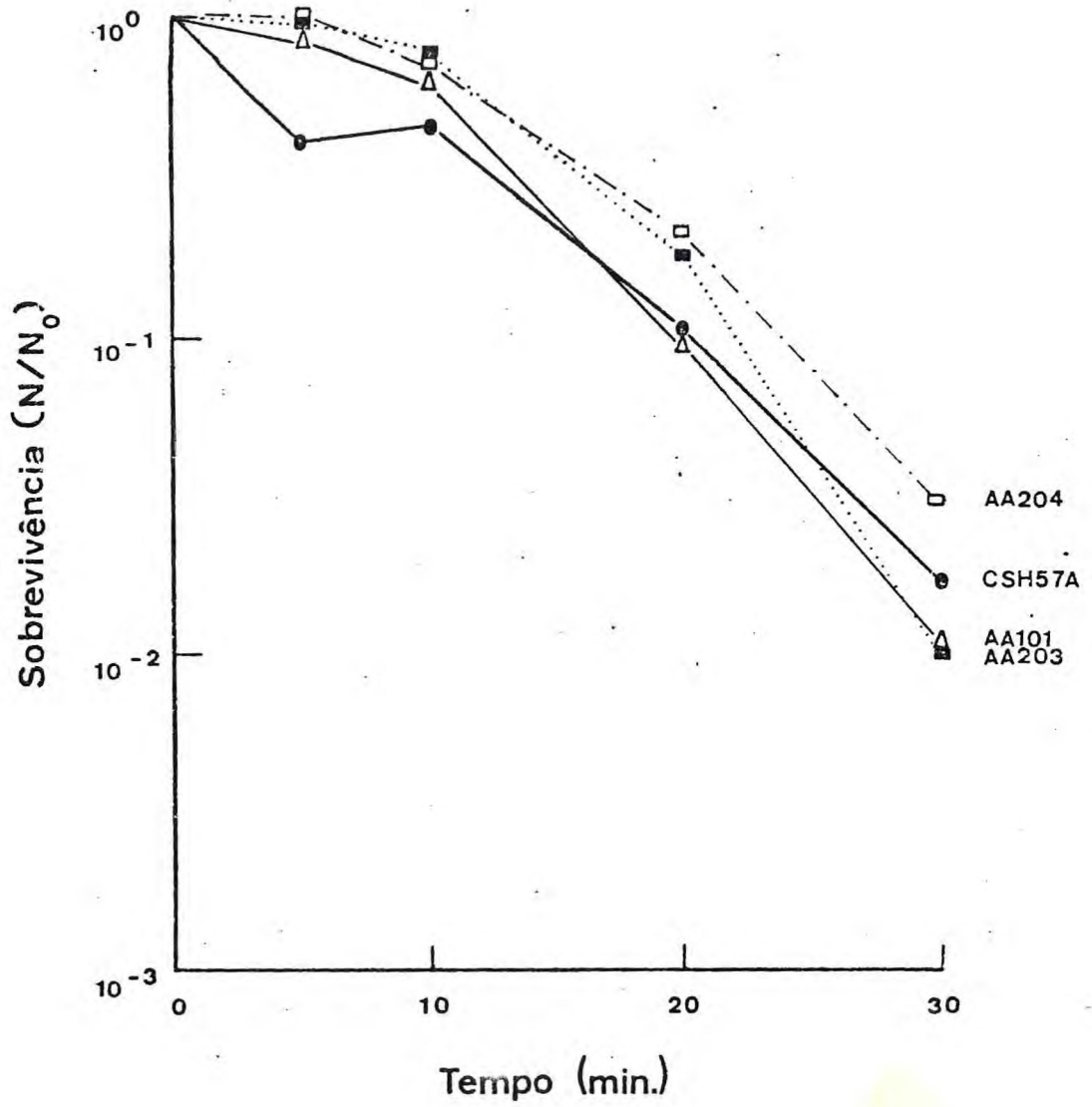


FIGURA 12 - Resposta dos clones AA203 (■.....■), AA204 (□-.-.□) e dos controles CSH57A (●——●) e AA101 (Δ——Δ) ao Ácido Nitroso.

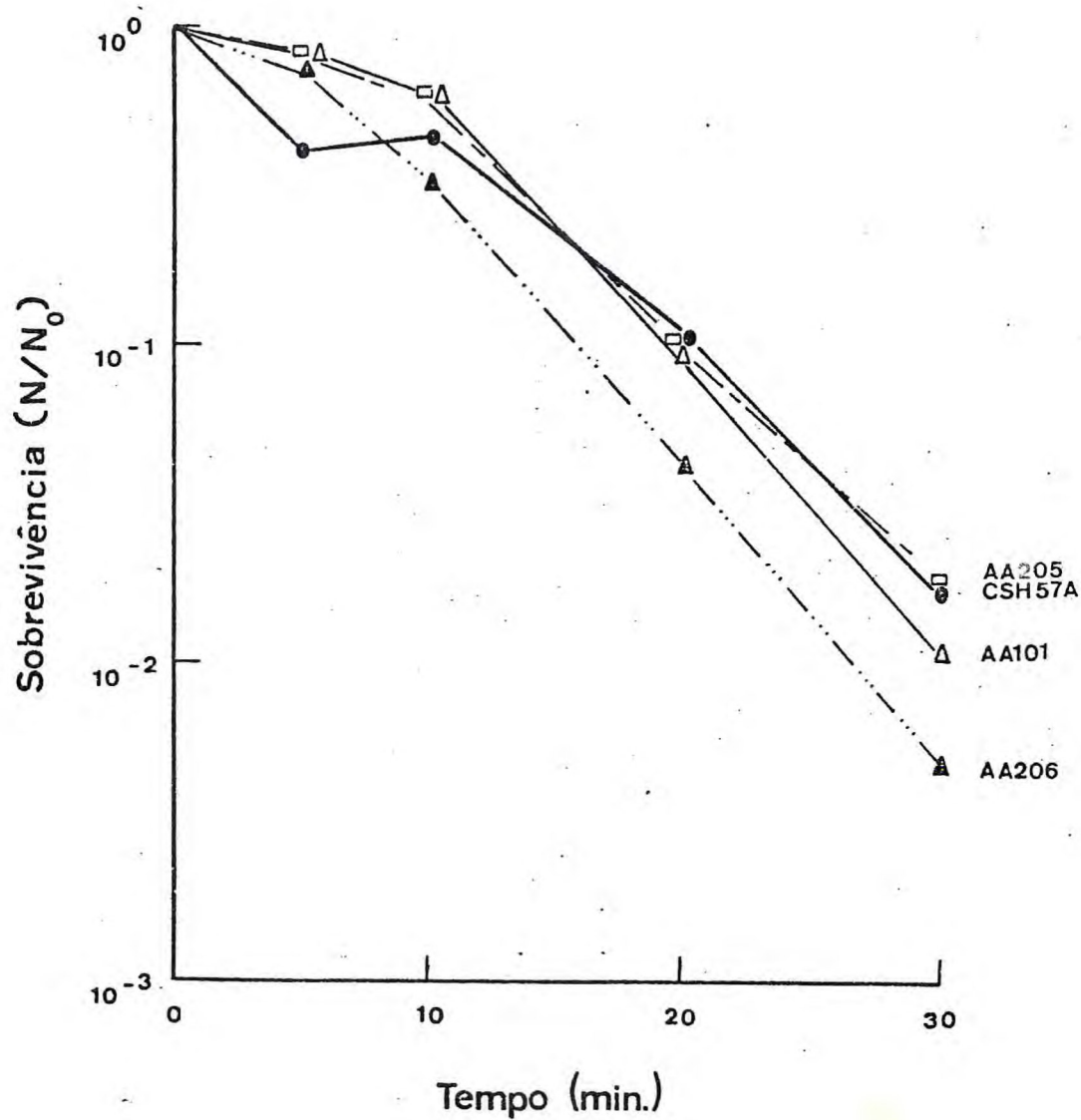


FIGURA 13 - Resposta dos clones AA205 (□— — —□), AA206 (▲—...—▲) e dos controles CSH57A (●— — —●) e AA101 (Δ— — —Δ) ao Ácido Nítrico.

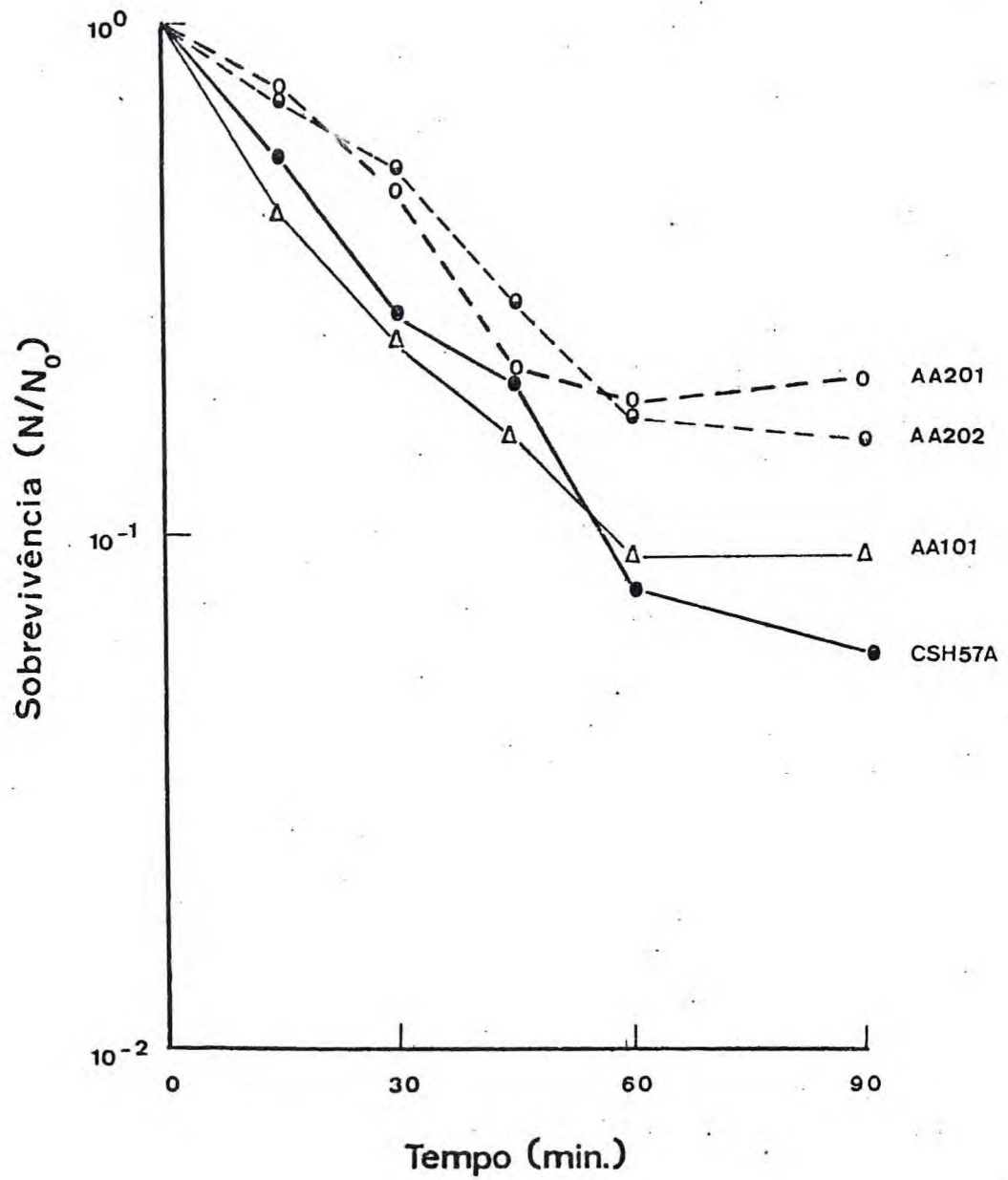


FIGURA 14 - Resposta dos clones AA201 (o - - - o), AA202 (o - - - o) e dos controles CSH57A (● - - - ●) e AA101 (Δ - - - Δ) à Nitrosoguanidina (200 µg/ml).

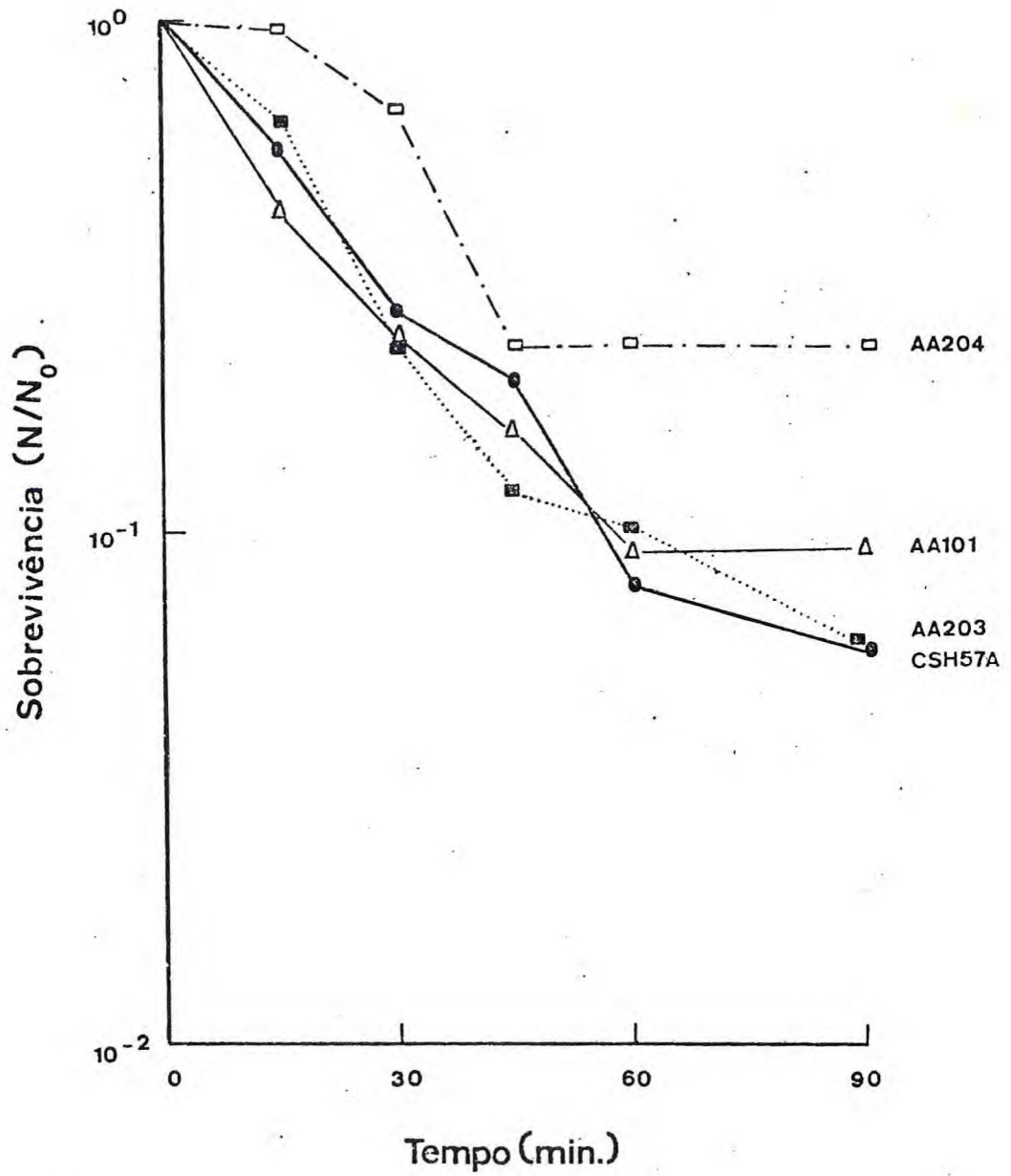


FIGURA 15 - Resposta dos clones AA203 (■.....■), AA204 (□—.—.□) e dos controles CSH57A (●————●) e AA101 (Δ————Δ) a Nitrosoguanidina (200  $\mu$ g/ml).

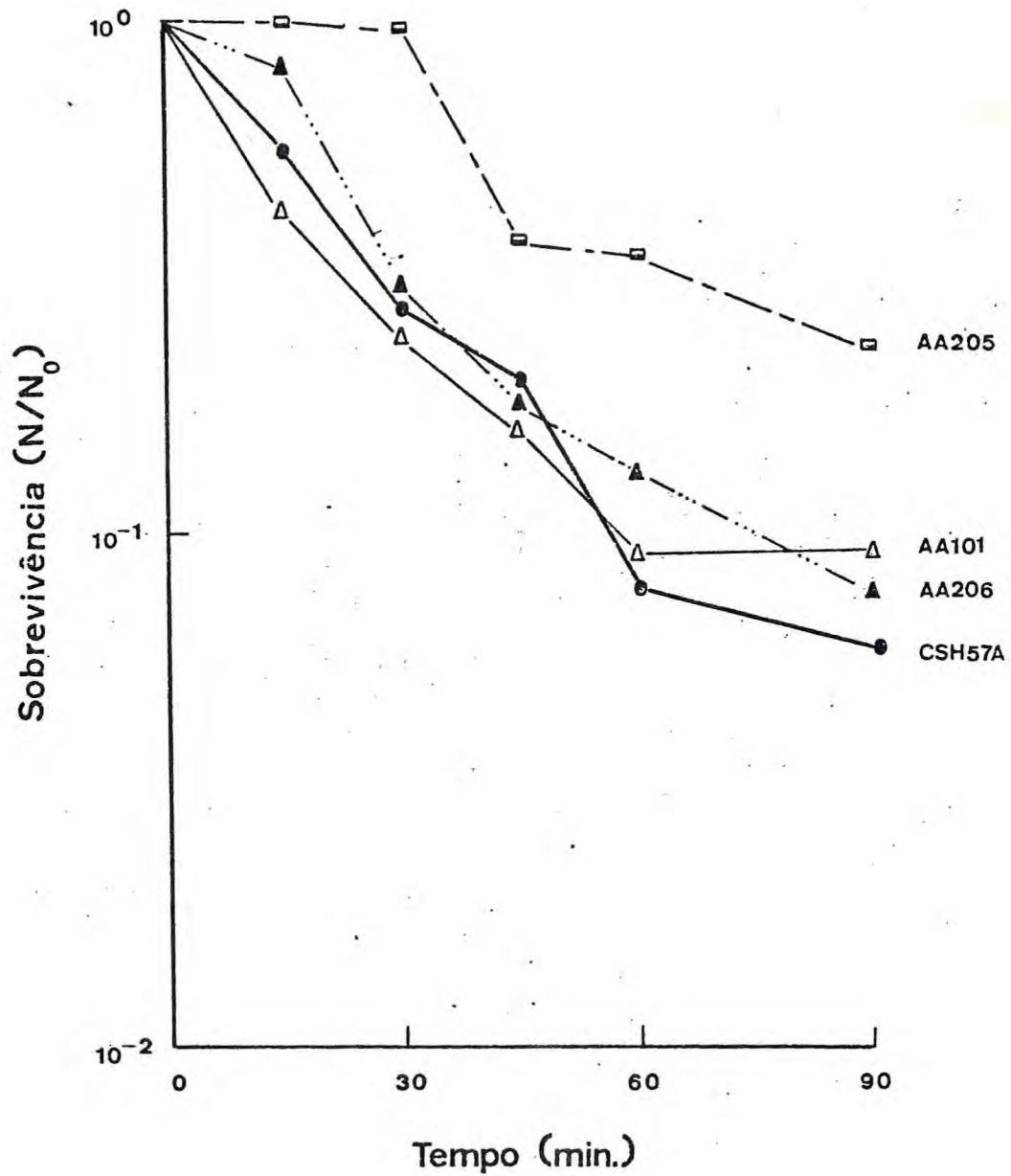


FIGURA 16 - Resposta dos clones AA205 (□ - - - □), AA206 (▲ - ··· - ▲) e dos controles CSH57A (● - - - ●) e AA101 (Δ - - - Δ) à Nitrosoguanidina (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 3.3.5 - Calor

A sobrevivência dos clones selecionados e dos controles após terem sido expostos a 52°C e em seguida incubados a 37°C está apresentada nas FIGURAS 17 (AA201, AA202, CSH57A e AA101), 18 (AA203, AA204, CSH57A e AA101) e 19 (AA205, AA206, CSH57A e AA101). As cepas AA201, AA202, AA203, AA205 e AA206 apresentam uma resistência ao calor um pouco maior do que CSH57A e igual a AA101, enquanto que a AA204 é, das cepas testadas, a mais resistente ao calor.

### 3.3.6 - Ácido Nalidíxico

A análise das réplicas em "Luria Agar" contendo 2, 4, 10 e 20 µg/ml de ácido nalidíxico, após uma noite de incubação a 37°C revelou que as cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205 e AA206 bem como os controles CSH57A e AA101 crescem normalmente em presença de 2 e 4 µg/ml de ácido nalidíxico. Em presença de 10 µg/ml de ácido nalidíxico o crescimento é reduzido, tornando-se nulo em presença de 20 µg/ml.

### 3.4 - Freqüências de mutação espontânea nos mutantes resistentes à Mitomicina C e nas células controle.

Os valores das freqüências de reversão espontânea  $\text{Trp}^- \rightarrow \text{Trp}^+$  e  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  para os mutantes AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206 e controles CSH57A e AA101 são apresentados na TABELA 3. Diante dos resultados podemos afirmar que não existem diferenças significativas entre as freqüências de mutação espontânea  $\text{Trp}^- \rightarrow \text{Trp}^+$  de AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206 e seus controles CSH57A e AA101. Em relação às freqüências de mutação espontânea  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ , os mutantes AA201 e AA202 apresentaram os valores dez e quatro vezes respectivamente mais elevados do que os controles CSH57A e

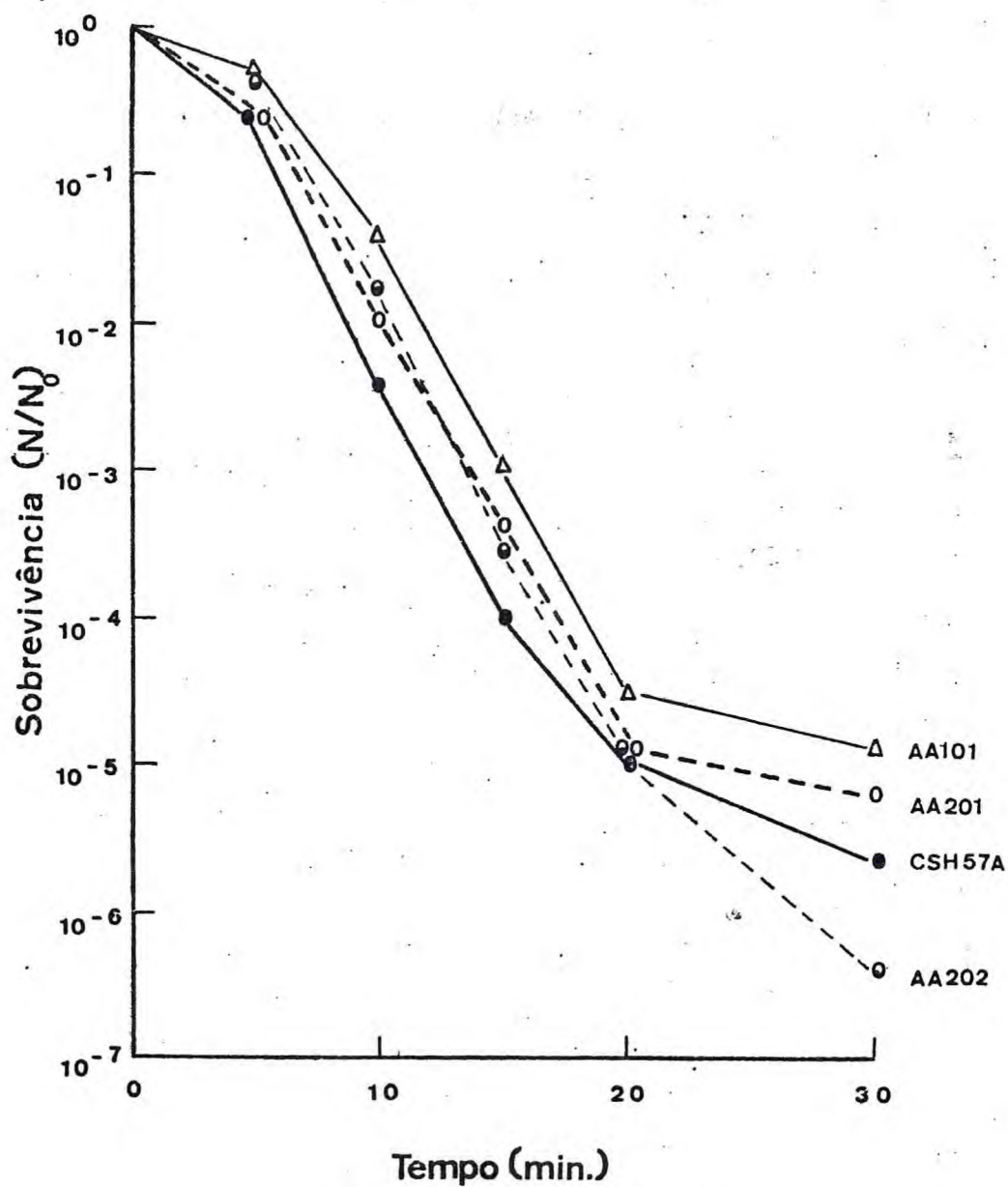


FIGURA 17 - Resposta dos clones AA201 (○ — — — ○), AA202 (● — — — ●) e dos controles CSH57A (● — — — ●) e AA101 (Δ — — — Δ) ao Calor (52°C).

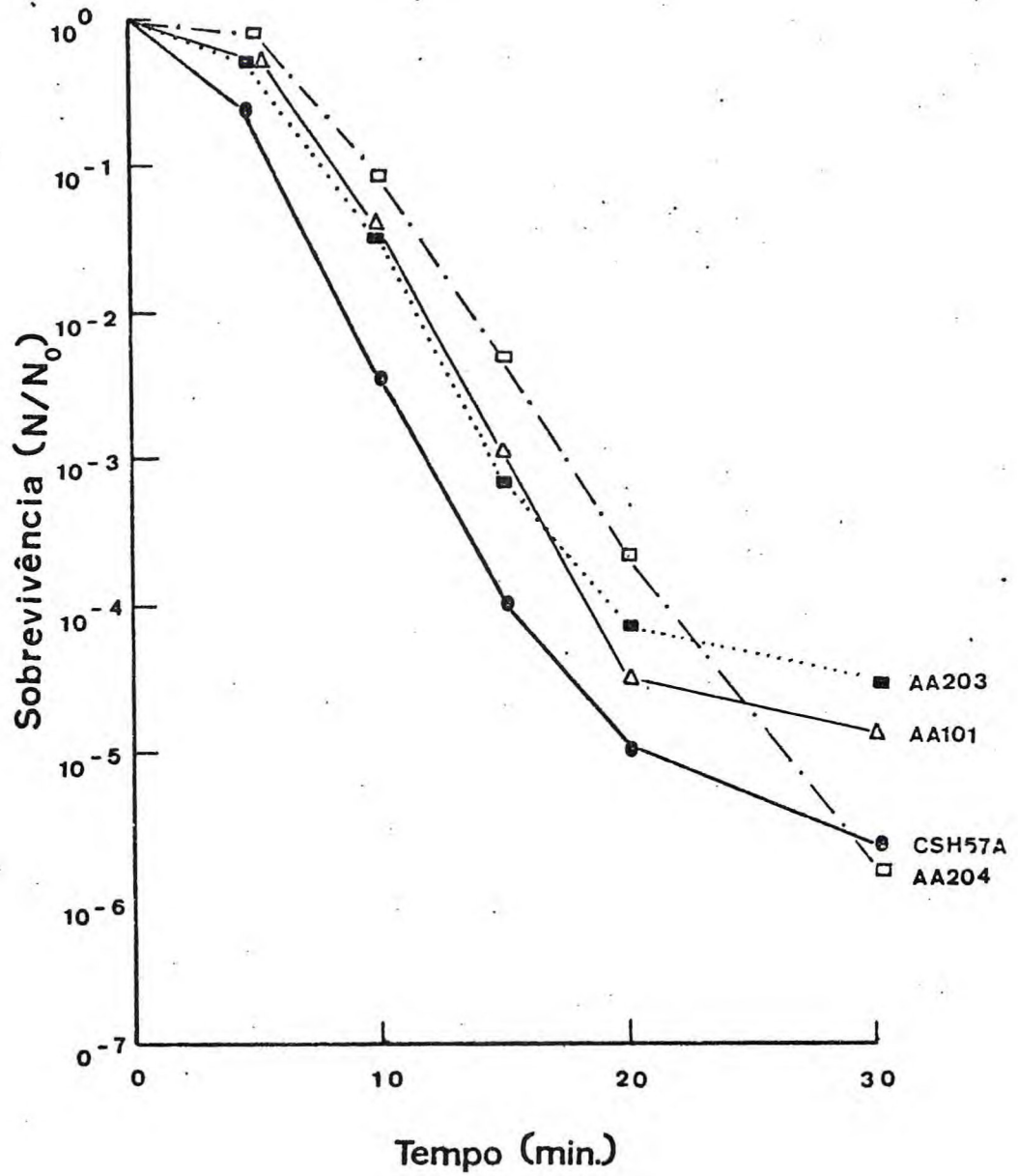


FIGURA 18 - Resposta dos clones AA203 (■.....■), AA204 (□-.-.□) e dos controles CSH57A (●——●) e AA101 (Δ——Δ) ao Calor (52°C).



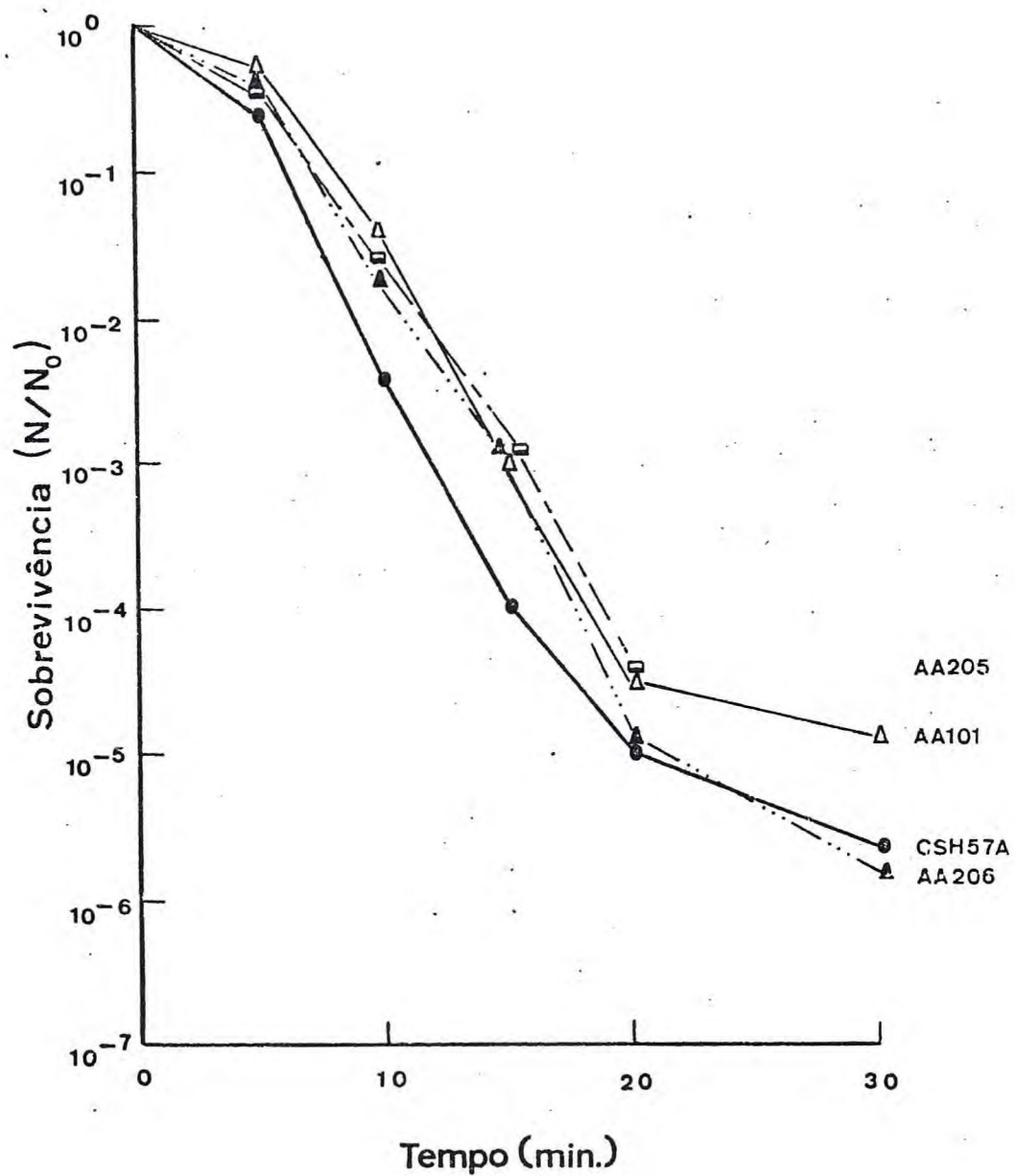


FIGURA 19 - Resposta dos clones AA205 (□ — — □), AA206 (▲ — ... — ▲) e dos controles CSH57A (● — — ●) e AA101 (△ — — — △) ao Calor (52°C).

TABELA 3 - Frequências de mutação espontânea nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206, CSH57A e AA101

Cepa	Mutação	Frequência de mutação $\pm$ desvio padrão <sup>(a)</sup>
CSH57A	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(1,55 $\pm$ 0,8) x 10 <sup>-9</sup>
CSH57A	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(5,16 $\pm$ 2,08) x 10 <sup>-11</sup>
AA101	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(1,18 $\pm$ 0,65) x 10 <sup>-9</sup>
AA101	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(7,95 $\pm$ 1,22) x 10 <sup>-11</sup>
AA201	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(1,31 $\pm$ 0,3 ) x 10 <sup>-9</sup>
AA201	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(8,41 $\pm$ 1,22) x 10 <sup>-10</sup>
AA202	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(8,68 $\pm$ 8,0 ) x 10 <sup>-10</sup>
AA202	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(2,35 $\pm$ 0,55) x 10 <sup>-10</sup>
AA203	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(2,32 $\pm$ 1,4 ) x 10 <sup>-9</sup>
AA203	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(1,08 $\pm$ 0,27) x 10 <sup>-10</sup>
AA204	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(3,69 $\pm$ 3,0 ) x 10 <sup>-10</sup>
AA204	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(9,94 $\pm$ 3,46) x 10 <sup>-11</sup>
AA205	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(7,29 $\pm$ 2,0 ) x 10 <sup>-10</sup>
AA205	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(2,73 $\pm$ 1,0 ) x 10 <sup>-11</sup>
AA206	Trp <sup>-</sup> →Trp <sup>+</sup>	(1,33 $\pm$ 0,1 ) x 10 <sup>-9</sup>
AA206	His <sup>-</sup> →His <sup>+</sup>	(7,14 $\pm$ 4,15) x 10 <sup>-11</sup>

(a) O desvio padrão foi calculado segundo a equação: 
$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{n - 1}}$$

AA101. Os demais mutantes não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles.

### 3.5 - Mutabilidade induzida por ultravioleta nos mutantes resistentes à Mitomicina C e nas células controle.

Os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ , induzidas por irradiação ultravioleta para os mutantes AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206 e seus controles CSH57A e AA101 estão discriminados na TABELA 4. Diante destes resultados podemos afirmar que as mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por ultravioleta nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205 e AA206 não são significativamente diferentes dos controles CSH57A e AA101, quando determinadas na ausência de histidina. Quando as mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por ultravioleta são determinadas em presença de histidina, os valores encontrados são de uma a duas ordens de grandeza mais elevados do que os valores correspondentes determinados na ausência de histidina. As mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por ultravioleta nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205 e AA206, em presença e ausência de histidina, não são significativamente diferentes dos controles CSH57A e AA101.

### 3.6 - Mutabilidade induzida por Mitomicina C nos mutantes resistentes à Mitomicina C e nas células controle.

Os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por Mitomicina C nos mutantes AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206 e seus controles CSH57A e AA101 encontram-se na TABELA 5. Diante dos resultados obtidos podemos afirmar que as mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por Mitomicina C, nos mutantes testados, não são significativamente diferentes dos controles, quando determinadas na presença de 0,8  $\mu\text{g/ml}$  de histidina. Isto independe de que a redução da viabilidade

TABELA 4 - Mutabilidade His<sup>-</sup>His<sup>+</sup> induzida por ultravioleta nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206, CSH57A e AA10.

Cepa	Mutabilidade	desvio padrão <sup>(a)</sup>
	Meio com histidina	Meio sem histidina
CSH57A	$(1,09 \pm 0,50) \times 10^{-5}$	$(1,95 \pm 1,00) \times 10^{-7}$
AA101	$(1,43 \pm 1,04) \times 10^{-5}$	$(3,35 \pm 1,00) \times 10^{-7}$
AA201	$(2,23 \pm 3,00) \times 10^{-5}$	$(4,12 \pm 4,40) \times 10^{-7}$
AA202	$(3,09 \pm 2,94) \times 10^{-6}$	$8,30 \times 10^{-8}$
AA203	$(1,06 \pm 0,21) \times 10^{-5}$	$(1,38 \pm 1,20) \times 10^{-6}$
AA204	$(5,61 \pm 3,00) \times 10^{-6}$	$(3,23 \pm 3,00) \times 10^{-7}$
AA205	$(2,30 \pm 2,80) \times 10^{-5}$	$(1,13 \pm 0,83) \times 10^{-6}$
AA206	$(4,97 \pm 3,38) \times 10^{-6}$	$(1,00 \pm 0,30) \times 10^{-7}$

(a) O desvio padrão foi calculado segundo a equação: 
$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{n - 1}}$$

TABELA 5 - Mutabilidade His<sup>-</sup>His<sup>+</sup>, induzida por Mitomicina C nas cepas AA201, AA202, AA203, AA204, AA205, AA206, CSH57A e AA101.

Cepa	Concentração de Mitomicina C (µg/ml)	Tempo de tratamento (min.)	Taxa de mutação ± desvio padrão <sup>(a)</sup>	
			Meio com histidina	Meio sem histidina
CSH57A	1	30	(1,97 ± 0,30) x 10 <sup>-7</sup>	2,38 x 10 <sup>-7</sup>
AA101	1	30	(1,93 ± 1,00) x 10 <sup>-7</sup>	5,00 x 10 <sup>-8</sup>
AA101	1	45	(1,47 ± 0,70) x 10 <sup>-7</sup>	6,30 x 10 <sup>-8</sup>
AA201	1	30	(1,27 ± 0,70) x 10 <sup>-7</sup>	(1,07 ± 0,70) x 10 <sup>-7</sup>
AA201	2	45	3,12 x 10 <sup>-7</sup>	1,3 x 10 <sup>-7</sup>
AA202	1	30	1,00 x 10 <sup>-7</sup>	2,94 x 10 <sup>-8</sup>
AA202	2	45	1,46 x 10 <sup>-7</sup>	7,1 x 10 <sup>-8</sup>
AA203	1	30	(1,57 ± 0,80) x 10 <sup>-7</sup>	(4,19 ± 0,5 ) x 10 <sup>-8</sup>
AA203	2	45	1,35 x 10 <sup>-7</sup>	(1,67 ± 0,5 ) x 10 <sup>-8</sup>
AA204	1	30	1,90 x 10 <sup>-7</sup>	9,80 x 10 <sup>-8</sup>
AA204	1	45	2,70 x 10 <sup>-7</sup>	1,38 x 10 <sup>-7</sup>
AA205	1	30	(5,72 ± 4,4 ) x 10 <sup>-8</sup>	4,16 x 10 <sup>-8</sup>
AA205	2	45	7,69 x 10 <sup>-7</sup>	1,31 x 10 <sup>-7</sup>
AA206	1	30	(1,56 ± 0,90) x 10 <sup>-7</sup>	4,16 x 10 <sup>-8</sup>

(a) O desvio padrão foi calculado segundo a equação: 
$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n.\bar{x}^2}{n - 1}}$$

produzida pelo tratamento com Mitomicina C seja de 10% ou inferior. Quando as mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por Mitomicina C são determinadas em ausência de histidina, os valores encontrados para as cepas AA201 e AA204 são iguais ao do controle CSH57A, e significativamente maiores que o do controle AA101. Nas cepas AA202, AA203, AA205 e AA206 aqueles valores são significativamente inferiores ao do controle CSH57A e iguais ao do controle AA101. Comparando-se os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ , induzidas por Mitomicina C, em ausência e presença de histidina, verificou-se que as cepas AA201, AA204, AA205 e controle CSH57A não apresentaram diferenças significativas nas duas situações. Por outro lado, as cepas AA202, AA203, AA206 e o controle AA101 apresentaram valores maiores de mutabilidade em presença de histidina do que em ausência.

## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 - Isolamento de mutantes resistentes à Mitomicina C

Após o tratamento de CSH57A pelo agente mutagênico Mitomicina C (SZIBALSKI, 1958) e objetivando maximizar a freqüência de mutação (ADELBERG et alii, 1965), foram isolados seis mutantes resistentes à Mitomicina C, o que corresponde a uma freqüência de mutação de  $1,2 \times 10^{-7}$ .

Embora tenha sido utilizado um tratamento mutagênico antes da etapa de seleção dos mutantes desejados, objetivando aumentar as chances de ocorrência dos mesmos, ainda assim não se pode eliminar a possibilidade de que os mutantes isolados, resistentes à Mitomicina C, tenham sido originados através de mutações espontâneas e simplesmente selecionados pelo procedimento empregado. Segundo GROSSMAN et alii (1975) a maioria dos mutantes de E.coli sensíveis ou resistentes à radiação UV, são também respectivamente sensíveis ou resistentes à Mitomicina C e outros agentes alquilantes. Tendo em mente este fato, procedeu-se à caracterização fenotípica dos novos mutantes isolados.

### 4.2 - Curvas de crescimento

Comparando-se os valores dos tempos de duplicação das cepas estudadas (TABELA 2) com as respectivas sobrevivências ao tratamento das mesmas por Mitomicina C (FIGURAS 5, 6 e 7), constata-se que os mutantes AA201 e AA202, que apresentam os tempos de duplicação mais longos (respectivamente 39 e 41 minutos) são aqueles que apresentam maior sobrevivência ao tratamento por Mitomicina C. É possível que

a maior resistência ao tratamento com Mitomicina C dos mutantes AA201 e AA202, quando comparados à resistência da cepa da qual foram derivados (CSH57A), seja uma consequência de seus maiores tempos de duplicação, o que implica em tempos mais longos entre divisões sucessivas. Isto permite um reparo mais eficiente das lesões introduzidas em seus genomas e, conseqüentemente, maior resistência. Embora esta explicação seja suficiente para justificar o aumento de resistência ao tratamento por Mitomicina C das cepas AA201 e AA202 e seja reforçada pela constatação de que o mutante AA202, com tempo de duplicação mais longo do que o do AA101, seja também o mais resistente dos dois, outras explicações são necessárias para justificar o comportamento dos demais mutantes (TABELA 2). É interessante salientar os resultados de CAPALDO-KIMBAL & BARBOUR (1971) que mostraram que todos os mutantes por eles estudados, deficientes em recombinação (recA, recB, recC e sbcA) e, conseqüentemente, deficientes em reparo de DNA, apresentaram tempos de duplicação aumentados, quando comparados com cepas isogênicas capazes de recombinação. Os resultados obtidos sugerem que os mutantes isolados apresentam mecanismos de reparo de DNA ainda não descritos.

#### 4.3 - Resposta dos mutantes resistentes à Mitomicina C e das células controle a agentes químicos e físicos.

Os mutantes AA201, AA202, AA203 e AA205 apresentaram acentuado aumento na resistência à Mitomicina C, quando comparados à cepa CSH57A da qual são derivados. Um dos fatores responsáveis por isso poderia ser um aumento na eficiência do sistema de reparo das ligações (pontes) entre as fitas complementares do DNA, formadas após o tratamento com Mitomicina C. Segundo IYER & SZYBALSKI (1963), tais pontes são formadas em número de aproximadamente 50 por genoma bacteriano após cinco minutos de exposição a 1 µg/ml



de Mitomicina C. De acordo com LIPSETT & WEISSBACH (1964) a alquilação com Mitomicina C aumenta com o conteúdo G-C do DNA.

COLE (1973) propôs um modelo para o reparo das ligações cruzadas no DNA envolvendo os processos de excisão (controlado pelo gen uvrB) e recombinação (controlado pelo gen recA). Tal modelo é compatível com os resultados de HOWARD-FLANDERS & LIN (1973) que demonstraram que os agentes formadores de ligações cruzadas no DNA estimulam ou induzem a recombinação genética.

Um outro fator que poderia ser responsável pelo aumento na resistência à Mitomicina C evidenciada pelos clones AA201, AA202, AA203 e AA205 seria uma alteração na permeabilidade da célula em relação à Mitomicina C. Esta não parece ser a explicação, ou pelo menos a única explicação, uma vez que estes mesmos clones apresentam uma resistência ao calor um pouco maior do que CSH57A e aproximadamente igual a AA101. Sendo assim, devem existir outros fatores diferentes da permeabilidade que são responsáveis pelas diferenças de sensibilidade à Mitomicina entre CSH57A e os mutantes AA201, AA202, AA203, AA205, bem como o AA101 (AQUINO, 1976). Alterações na superfície celular apresentadas por um mutante sensível à Mitomicina C, mtc, o qual também apresentava sensibilidade ao dodecil sulfato de sódio foram encontradas por HIGASHI et alii (1981).

SMALL et alii (1976) trabalhando com mutantes de Haemophilus influenzae que não possuíam a enzima nuclease ATP-dependente (mutantes Add<sup>-</sup>), verificaram que tais mutantes apresentavam pequenos desvios na sensibilidade à Mitomicina C em relação ao tipo selvagem e que tais diferenças eram substanciais, apenas quando as células cresciam e se dividiam na presença de Mitomicina C. Os autores concluíram que esses mutantes são sensíveis à Mitomicina C apenas porque são mais permeáveis ao composto em um certo estágio da divisão celular. Eles também encontraram que esses mutantes são mais sensíveis à Estreptomicina, o que está de

acordo com a hipótese acima, pois os dois antibióticos precisam entrar na célula a fim de exercer seu efeito biológico.

BOYCE & HOWARD-FLANDERS (1964) encontraram que mutantes sensíveis à radiação UV são também mais sensíveis à Mitomicina C. Tais mutantes são designados  $Uvr^-$  por sofrerem mutação em quaisquer dos três loci genéticos conhecidos como uvrA, uvrB ou uvrC. Estes genes controlam a excisão de fotoprodutos do DNA, a qual é acompanhada pela degradação do DNA (SETLOW & CARRIER, 1964). Segundo BOYCE & HOWARD-FLANDERS (1964) os mutantes  $Uvr^-$  de E.coli K-12 apresentam pouca degradação no DNA após tratamento por Mitomicina C ou radiação UV, ao contrário da cepa original  $Uvr^+$ , que apresenta uma maior degradação de seu DNA após tratamento por qualquer desses dois agentes. Baseado em tais resultados BOYCE & HOWARD-FLANDERS sugeriram que os danos causados ao DNA bacteriano por qualquer um desses agentes devem ser reparados pelo mesmo mecanismo molecular. Em 1968 IMAE encontrou acidentalmente um mutante sensível à Mitomicina C. Entretanto a sensibilidade desse mutante à ação da radiação UV era a mesma do tipo selvagem. IMAE sugeriu que a alta susceptibilidade daquele mutante à Mitomicina C poderia ser devido a um defeito na "barreira de permeabilidade" ou no "sistema de inativação" da célula ao antibiótico. Contrastando com esses resultados, os mutantes AA201, AA202, AA203, AA204, AA205 e AA206 apresentaram a mesma sensibilidade à radiação UV quando comparados à cepa CSH57A (FIGURAS 8, 9 e 10). É interessante observar que o clone AA202, que apresentou maior resistência à Mitomicina C foi o que, aparentemente, apresentou maior sensibilidade à UV (FIGURA 8). O clone AA206, que apresentou maior sensibilidade à Mitomicina C (FIGURA 7) foi o que apresentou maior resistência ao UV, quando comparados aos controles CSH57A e AA101. Portanto, em relação aos mutantes isolados neste trabalho sugerimos que as lesões provocadas por Mitomicina C são reparadas por um mecanismo distinto daqueles que reparam as lesões provocadas por UV.

Outro agente químico usado neste trabalho foi o ácido nitroso. Conforme se verifica nas FIGURAS 11, 12 e 13 as respostas dos mutantes ao tratamento com ácido nitroso são muito semelhantes às dos controles CSH57A e AA101, com exceção do clone AA204, que parece ser ligeiramente mais resistente que CSH57A, e do AA206, que é ligeiramente mais sensível que os controles. Pode-se então concluir, que para aqueles mutantes que apresentaram acentuado aumento na resistência à Mitomicina C, ou seja, AA201, AA202, AA203 e AA205, a mutação que conferiu esse aumento na resistência não afetou o sistema de reparo de danos causados pelo ácido nitroso (LINDAHL, et alii 1977; KARRAN & LINDAHL, 1978).

Como se sabe, a Mitomicina C e a nitrosoguanidina são agentes alquilantes produzindo, no entanto, diferentes efeitos no DNA celular; enquanto a nitrosoguanidina produz metilações e algumas alterações estruturais (CERDÁ-OLMEDO & HANAWALT, 1968) a Mitomicina C produz a formação de pontes entre as cadeias de DNA. Dessa maneira, usando-se a nitrosoguanidina, dos quatro clones que apresentaram acentuado aumento de resistência à Mitomicina C (AA201, AA202, AA203 e AA205), três deles, AA201, AA202 e AA205, apresentaram igualmente aumento de resistência à nitrosoguanidina, quando comparados à cepa CSH57A (FIGURAS 14, 15 e 16). É portanto provável que, nos mutantes AA201, AA202 e AA205, alguns passos envolvidos no reparo de danos causados por nitrosoguanidina sejam comuns ao reparo de danos causados por Mitomicina C.

No que diz respeito à resposta ao tratamento pelo calor, os mutantes isolados neste trabalho apresentaram uma resistência igual à do controle AA101 (FIGURAS 17, 18 e 19), o qual, por sua vez, apresentou uma sobrevivência maior do que CSH57A, como já havia sido demonstrado por AQUINO (1976). Isso indica que a eficiência de reparo de danos causados pelo calor é maior nos mutantes isolados, principalmente no AA204, que é o mais resistente ao calor (FIGURA 18) e também ao ácido nitroso e à nitrosoguanidi-

na. O comportamento do clone AA204 sugere que os mecanismos de reparo de danos causados por calor, ácido nitroso e nitrosoguanidina devem ter etapas comuns. Isto poderia ser explicado através da ação das endonucleases e insertases que funcionam no reparo de despurinações que ocorrem espontaneamente (BEHMOARAS et alii, 1981), por ação do calor (GREER & ZAMENHOF, 1962; BRIDGES et alii, 1969) ou por agentes alquilantes (LJUNGQUIST et alii, 1976; YAMAMOTO et alii, 1978).

O efeito do ácido nalidíxico nos mutantes revelou que os mesmos apresentaram a mesma sensibilidade a este agente químico que os controles CSH57A e AA101.

De acordo com a classificação apresentada por HANE & WOOD (1969), baseada na capacidade de formar colônias em agar nutriente suplementado com ácido nalidíxico, as cepas usadas neste trabalho pertencem ao grupo NaIB<sup>r</sup>.

VON WRIGHT & BRIDGES (1981) encontraram que uma mutação gyrB altera o reparo da DNA por excisão e pós-replicação, em E.coli. MCDANIEL et alii (1978) trabalhando com mutantes de E.coli deficientes em recombinação observaram que bloqueios genéticos das rotas RecBC ou RecF resultavam numa sensibilidade aumentada ao ácido nalidíxico, quando comparados com o tipo selvagem. As mutações que resultaram em aumento de resistência à Mitomicina C nos mutantes isolados provavelmente não afetaram as características da DNA girase e, conseqüentemente, não interferiram no reparo de DNA por excisão e pós-replicação nem nas rotas RecBC e RecF.

#### 4.4 - Freqüência de mutação espontânea nos mutantes resistentes à Mitomicina C e nas células controle.

Nos mutantes obtidos neste trabalho as freqüências de mutações espontâneas foram calculadas para as reversões

Trp<sup>-</sup>→Trp<sup>+</sup> e His<sup>-</sup>→His<sup>+</sup>. Segundo STENT & CALENDAR (1978) as mutações reversas, do tipo His<sup>-</sup>→His<sup>+</sup>, devem ocorrer a uma frequência muito menor do que as do tipo His<sup>+</sup>→His<sup>-</sup>, pelo fato de que nestas últimas o fenótipo do mutante é decorrente da perda de função catalítica de uma enzima como consequência de uma mutação no gen que codifica para a estrutura primária dessa proteína. Tal mutação poderia ocorrer pela substituição de qualquer um dos muitos aminoácidos da cadeia polipeptídica, aumentando assim a probabilidade de sua ocorrência. Na mutação reversa apenas aquele dano ou aquela lesão particular, que provocou a perda da função, é que deve ser reparado.

Em relação à reversão Trp<sup>-</sup>→Trp<sup>+</sup> parece não haver diferenças significativas entre os valores de frequências de mutação nos mutantes e controles (TABELA 3). Em relação à reversão His<sup>-</sup>→His<sup>+</sup>, no entanto, os resultados parecem indicar que os mecanismos responsáveis pelo aumento na eficiência do reparo de danos causados pela Mitomicina C alteraram a frequência de mutação espontânea nos mutantes AA201 e AA202, cujos valores de frequência de mutação são aproximadamente dez e quatro vezes respectivamente mais elevados do que CSH57A. Isso implica em que a mutação responsável pelo aumento de resistência à Mitomicina C nos referidos mutantes, de algum modo afeta simultaneamente a fidelidade de síntese de DNA. Isto poderia ser uma consequência tanto de uma modificação em uma DNA polimerase (TAIT et alii, 1974; SADAIE & NARUI, 1976; JOHNSON, 1978) quanto da produção constitutiva de uma DNA polimerase mutagênica normalmente indutível (MOUNT, 1977), nos mutantes AA201 e AA202. Nos demais mutantes isolados, o aumento de resistência à Mitomicina C parece envolver mecanismos que, direta ou indiretamente, não afetam a frequência de mutação espontânea nos mesmos.

4.5 - Mutabilidade induzida por ultravioleta e Mitomicina C nos mutantes resistentes à Mitomicina C e nas células controle.

Para os mutantes isolados neste trabalho parece não ter havido alteração nas mutabilidades induzidas por UV para a reversão  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  em relação aos controles CSH57A e AA101 (TABELA 4). Os valores das mutabilidades induzidas por UV, em meio contendo traços de histidina, mostraram ser de uma a duas ordens de grandeza mais elevados do que aqueles determinados em meio sem histidina, mostrando que a histidina contida no meio mínimo, mesmo sendo em pouquíssima quantidade, permitiu que um número maior de células revertentes  $\text{His}^+$  formasse colônias visíveis, elevando assim os valores das mutabilidades.

A mutabilidade induzida representa um dos parâmetros que reflete a natureza qualitativa e quantitativa da resposta SOS (WITKIN, 1976; MCENTEE, 1977; OLAGORTA, 1982). Em virtude da inalterabilidade da resposta SOS, para os mutantes isolados neste trabalho, podemos dizer que os gens recA e lexA não sofreram alteração e, conseqüentemente, os mecanismos responsáveis pelo aumento de resistência dos mutantes isolados independe da resposta SOS (MCENTEE, 1977; LITTLE & HARPER, 1979; HANAWALT et alii, 1979; TRGOVČEVIC et alii, 1980). Quando se compara os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por UV com os valores das mutabilidades  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$  induzidas por Mitomicina C (TABELAS 4 e 5) verificamos que estes últimos são de uma a duas ordens de grandeza menores que os primeiros. Isto indica que as lesões provocadas por Mitomicina C são reparadas por mecanismos específicos e de eficiência bem maior do que os mecanismos que reparam as lesões provocadas por UV.

## 5 - CONCLUSÕES

- 1 - Foram isolados seis mutantes de E.coli K-12 resistentes à Mitomicina C: AA201, AA202, AA203, AA204, AA205 e AA206.
- 2 - As mutações responsáveis pelo aumento da resistência à Mitomicina C para os mutantes AA201, AA202 e AA205 também afetam o reparo de lesões causadas por nitrosoguanidina, por conseguinte alguns passos envolvidos no reparo de danos causados por nitrosoguanidina são comuns ao reparo de danos causados por Mitomicina C.
- 3 - As mutações que conferiram aumento na resistência à Mitomicina C (AA201, AA202, AA203 e AA205) não afetaram o reparo de danos causados pelo ácido nitroso.
- 4 - As mutações que resultaram em aumento de resistência à Mitomicina C não afetaram as características da DNA girase.
- 5 - A resistência à Mitomicina C nos seis mutantes isolados não parece ser devida a uma diminuição da permeabilidade celular.
- 6 - As lesões provocadas por Mitomicina C são reparadas por um mecanismo distinto daqueles que reparam as lesões provocadas por UV.
- 7 - As mutações responsáveis pelo aumento de resistência à Mitomicina C nos mutantes AA201 e AA202 afetaram também a frequência de mutação espontânea.
- 8 - Nos mutantes AA203, AA204, AA205 e AA206 o aumento de resistência à Mitomicina C deve envolver mecanismos

que, direta ou indiretamente, não afetam a frequência de mutação espontânea.

- 9 - As lesões provocadas por Mitomicina C nos seis mutantes isolados são reparadas com uma eficiência bem maior do que as lesões provocadas por UV.
- 10 - As características dos mutantes isolados sugerem tratar-se de mutantes originais.



6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELBERG, E.A., M.Mandel & G.C.C.Chen. Optimal conditions for mutagenesis by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine in Escherichia coli K-12. Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 788-795, 1965.
- AQUINO, A.M. Increased DNA repair proficiency in an Escherichia coli K-12 mutant resistant to Mitomycin C. molecular and genetic studies. Ph.D.Dissertation. Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA), Los Angeles, Califórnia, EE.UU., 1976.
- BACHMANN, B.J. Linhage map of Escherichia coli K-12, edition 7. Microbiol. Rev. 47, 180-230, 1983.
- BEHMOARAS, T., J.J.Toulmē & C.Helene. Specific recognition of apurinic sites in DNA by a tryptophan-containing peptide. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 78, 926-930, 1981.
- BOYCE, R.P. & P.Howard-Flanders. Genetic control of DNA breakdown and repair in E.coli K-12 treated with Mitomycin C or Ultraviolet light. Z.Vererbungs1. 95, 345-350, 1964.
- \_\_\_\_\_. Release of Ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E.coli K-12. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 51, 293-300, 1964.
- BRIDGES, B.A., M.J. Ashwood-Smith & R.J.Munson. Susceptibility of mild thermal and of ionizing radiation damage to the same recovery mechanisms in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 193-196, 1969.
- CANOSI, U., A.G. Siccardi, A.Falashi & G.Mazza. Effect of deoxyribonucleic acid replication inhibitors on bacterial

- recombination. J.Bacteriol.126, 108-121, 1976.
- CAPALDO-KIMBALL, F. & S.D. Barbour. Involvement of recombination genes in growth and viability of Escherichia coli K-12. J.Bacteriol. 106, 204-212, 1971.
- CERDÁ-OLMEDO, E. & P.C. Hanawalt. Diazomethane as the active agent in Nitrosoguanidine mutagenesis and lethality. Molec.Gen.Genet.101, 191-202, 1968.
- CHASE, J.W., W.E.Masker & J.B.Murphy. Pyrimidine dimer excision in Escherichia coli strains deficient in exonuclease V and VII and in the 5'→3' exonuclease of DNA polymerase I. J.Bacteriol.137, 234-242, 1979.
- CHASE, J.W. & C.C.Richardson. Exonuclease VII of E.coli: mechanism of action. J.Biol.Chem.249, 4553-4561, 1974.
- COLE, R.S. Repair of DNA containing interstrand crosslinks in Escherichia coli: sequential excision and recombination. Proc.Natl.Acad.Sci(USA) 70, 1064-1068, 1973.
- COZZARELLI, Nicholas R. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. Science 207, 953-960, 1980.
- DA ROZA, R., E.C. Friedberg, B.K.Duncan & H.R.Warner. Repair of nitrous acid damage to DNA in Escherichia coli. Biochem.16, 4934-4939, 1977.
- DUNCAN, B.K., P.A.Rockstroh & H.R.Warner. Escherichia coli K-12 mutants deficient in uracil-DNA glycosylase. J. Bacteriol.134, 1039-1045, 1978.
- FAIRWEATHER, N.F., E.Orr & I.B. Holland. Inhibition of deoxyribonucleic acid gyrase: effects on nucleic acid synthesis and cell division in Escherichia coli K-12. J.Bacteriol.142, 153-161, 1980.
- GANESAN, A.K. Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated

- E.coli K-12. J.Mol.Biol.87, 103-119, 1974.
- GANESAN, A.K., P.C.Seawell & D.W.Mount. Effect of tsl (thermosensitive supressor of lex) mutation post-replication repair in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 135, 935-942, 1978.
- GELLERT, M., K.Mizuuchi, M.H.O'Dea & H.A.Nash. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc.Natl.Acad.Sci)USA)73, 3872-3876, 1976.
- GELLERT, Martin. DNA topoisomerases. Ann.Rev.Biochem.50, 879-910, 1981.
- GÓMEZ-EICHELMANN, M.C. Effect of nalidixic acid and novobiocin on pBR322 genetic expression in Escherichia coli minicells. J.Bacteriol.148, 645-752, 1981.
- GOSS, W.A., W.H.Deitz & T.M.Cook. Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. J.Bacteriol.89, 1068-1074, 1965.
- GOTTESMAN, Susan. Genetic control of the SOS system in E.coli. Cell, 23, 1-2, 1981.
- GOZE, A. & R.Devoret. Repair promoted by plasmid pKM101 is different from SOS repair. Mut.Res.61, 163-179, 1979.
- GRECZ, N. & S.Bhatarakamol. Apurinic acid endonuclease implicated in DNA breakage in Escherichia coli subjected to mild heat. Biochem.Biophys.Res.Comm.77, 1183-1188, 1977.
- GREER, S. & S.Zamenhof. Studies on depurination of DNA by heat. J.Molec.Biol.4, 123-141, 1962.
- GROSSMAN, L., A.Braun, R.Feldberg & I.Mahler. Enzymatic repair of DNA. Ann.Rev.Biochem.44, 19-43, 1975.
- GROSSMAN, L., S.Riazuddin, W.A.Haseltine & C. Lindan.

Nucleotide excision repair of damaged DNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 947-955, 1978.

HANAWALT, P.C., P.K.Cooper, A.K.Ganesan & C.A. Smith. DNA repair in bacteria and mammalian cells. Ann.Rev.Biochem. 48, 783-836, 1979.

HANAWALT, P.C., P.K.Cooper, A.K.Ganesan, R.S.Lloyd, C.A. Smith & M.E.Zolan. Repair responses to DNA damage: enzymatic pathways in *E.coli* and human cells. J.Cell. Biochem. 18, 271-283, 1982.

HANE, M.W. & T.W.Wood. *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. J.Bacteriol. 99, 238-241, 1969.

HASELTINE, W.A., L.K.Gordon, C.P.Lindan, R.H. Grafstrom, N.L.Shaper & L.Grossman. Cleavage of pyrimidine dimers in specific DNA sequences by a pyrimidine dimer DNA-glycosylase of *M.luteus*. Nature 285, 634-641, 1980.

HIGASHI, T., K.Suzuki & N.Otsuji. Sodium dodecyl sulfate-sensitive separation in a mitomycin C-sensitive, *mtc*, mutant of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 146. 1117-1123, 1981.

HOWARD-FLANDERS, P. & P.F.Lin. Genetic recombination induced by DNA cross-links in repressed phage  $\lambda$ . Genetics.Supp. 73, 85-90, 1973.

IMAE, Yasuo. Mitomycin C-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12. J.Bacteriol. 95, 1191-1192, 1968.

IYER, V.N. & W.Szybalski. A molecular mechanism of mitomycin action: linking of complementary DNA strands. Proc.Natl. Acad.Sci.(USA) 50, 355-362, 1963.

\_\_\_\_\_. Mitomycins and porfiromycin: chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA. Science, 145, 55.58, 1964.

- JEGGO, P., M.Defais, L.Samson & P.Schendel. An adaptive response of E.coli to low levels of alkylating agent: comparison with previously characterised DNA repair pathways. Molec.Gen.Genet.157, 1-9, 1977.
- \_\_\_\_\_. The adaptive response of E.coli to low levels of alkylating agent: the role of polA in killing adaptation. Molec.Gen.Genet.162, 299-305, 1978.
- JOHNSON, Robert. Reduction of postreplication DNA repair in two Escherichia coli mutants with temperature-sensitive polymerase III activity: implications for the postreplication repair pathway. J.Bacteriol.136, 125-130, 1978.
- KAPLAN, D.J. & L.H.Hurley. Anthramycin binding to deoxyribonucleic acid-mitomycin C complexes. Evidence for drug-induced deoxyribonucleic acid conformational change and cooperativity in mitomycin C binding. Biochem.20, 7572-7580, 1981.
- KARRAN, P. & T.Lindahl. Enzymatic excision of free hypoxanthine from polydeoxynucleotides and DNA containing deoxyinosine monophosphate residues. J.Biol.Chem.253, 5877-5879, 1978.
- \_\_\_\_\_. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. Biochem.19, 6005-6011, 1980.
- KELLY, R.B., N.R.Cozzarelli, M.P.Deutscher, I.R. Lehman & A.Kornberg. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. J.Biol.Chem.245, 39-45, 1970.
- KLEVAN, L. & J.C.Wang. Deoxyribonucleic acid-gyrase-deoxy-

- ribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an  $\alpha_2\beta_2$  protein core. Biochem. 19, 5229-5234, 1980.
- KORNBERG, Arthur. DNA Synthesis. São Francisco. W.H. Freeman and Company, 1974, pg. 127.
- LACKS, S. & B. Greenberg. Complementary specificity of restriction endonucleases of Diplococcus pneumoniae with respect to DNA methylation. J. Mol. Biol. 114, 153-168, 1977.
- LAVIN, M.F., A. Jenkins & C. Kidson. Repair of ultraviolet light-induced damage in Micrococcus radiophilus, an extremely resistant microorganism. J. Bacteriol. 126, 587-592, 1976.
- LEHMAN, I.R. DNA ligase: structure, mechanism and function. Science 186, 790-797, 1974.
- LINDAHL, Tomas. DNA repair enzymes. Ann. Rev. Biochem. 51, 61-87, 1982.
- LINDAHL, T., S. Ljungquist, W. Siegert, B. Nyberg & B. Sperens. DNA N-glycosidases - Properties of uracil-DNA glycosidase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 252, 3286-3294, 1977.
- LIPSETT, M.N. & A. Weissbach. The site of alkylation of nucleic acids by mitomycin. Biochem. 4, 206-211, 1965.
- LITTLE, J.W. & J.E. Harper. Identification of the lexA gene product of Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 6147-6151, 1979.
- LITTLE, J.W., D.W. Mount & C.R. Yanisch-Perron. Purified lexA protein is a repressor of the recA and lexA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 4199-4203, 1981.
- LIVINGSTON, D.M. & C.C. Richardson. DNA polymerase III of

- E.coli: characterization of associated exonuclease activities. J.Biol.Chem.250, 470-478, 1975.
- LJUNGQUIST, S., T.Lindahl & P.Howard-Flanders. Methyl methane sulfonate-sensitive mutant of Escherichia coli deficient in an endonuclease specific for apurinic sites in deoxyribonucleic acid. J.Bacteriol.126, 646-653, 1976.
- MARIANS, K.J., J.-E Ikeda, S.Schlagman & J.Jurwitz. Role of DNA gyrase in  $\phi$ X replicative-form replication in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci(USA)74, 1965-1968, 1977.
- MARINUS, M.G. Adenine methylation of Okasaki fragments in Escherichia coli.J.Bacteriol.128, 853-854, 1976.
- MARINUS, M.G. & N.R. Morris. Isolation of DNA methylase mutants of Escherichia coli K-12. J.Bacteriol.114, 1143-1150, 1973.
- MCDANIEL, L.S., L.H.Rogers & W.E.Hill. Survival of recombination-deficient mutants of Escherichia coli during incubation with nalidixic acid. J.Bacteriol.134, 1195-1198, 1978.
- MCENTEE, Kevin. Protein X is the product of the recA gene of Escherichia coli. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)74, 5275-5279, 1977.
- MCGRATH, R.A. & R.W.Williams. Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia coli deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces. Nature 212, 534-535, 1966.
- MILLER, Jeffrey H. Experiments in molecular genetics, New York - Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. pg. 125.
- MIZUUCHI, K., M.Fisher, M.H.O'Dea & M.Gellert. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. Proc.Natl.Acad.Sci(USA) 77, 1847-1951, 1980.

- MOUNT, David W. A mutant of Escherichia coli showing constitutive expression of the lysogenic induction and error-prone DNA repair pathways. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)74, 300-304, 1977.
- NAKABEPPU, Y. & M.Sekiguchi. Physical association of pyrimidine dimer DNA glycosylase and apurinic/aprimidinic DNA endonuclease essential for repair ultraviolet-damaged DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)78, 2742-2746, 1981.
- OLAGORTA, José R. Pellon. DNA repair systems. Rev.Microbiol. 13, 101-109, 1982.
- RADMAN, K., G.Villani, S.Boiteux, A.K. Kinsella, B.W. glickman & S. Spadari. Replicational fidelity: mechanisms of mutation avoidance and mutation fixation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 937-946, 1979.
- ROBERTS, J.W., C.W.Roberts & N.L.Craig. Escherichia coli recA gene product inactivates phage  $\lambda$  repressor. Proc. Natl.Acad.Sci(USA)75, 4714-4718, 1978.
- ROBERTS, R.J. & P.Strike. Efficiency of Escherichia coli repair processes on UV-damaged transforming plasmid DNA. Plasmid 5, 213-220, 1981.
- RUPERT, C.S. Enzymatic photoreactivation: overview in Molecular mechanisms for repair of DNA. P.C. Hanawalt & R.B.Setlow(eds.) parte A. Plenum Press, New York e London, p. 73-87, 1975.
- RUPP, W.D. & P.Howard-Flanders. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of Escherichia coli following ultraviolet irradiation. J. Mol. Biol. 31, 291-304, 1968.
- RUPP. W.D., C.E.Wilde III, D.L.Reno & P.Howard-Flanders. Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated Escherichia coli. J.Mol.Biol.61, 25-44, 1971.



- SADAIE, Y. & K.Narui. Repair deficiency, mutator activity, and thermal prophage inducibility in dna-8132 strains of Bacillus subtilis. J.Bacteriol. 126, 1037-1041, 1976.
- SAMSON, L. & J.Cairns. A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. Nature 267, 281-283, 1977.
- SAMSON, L. & J.L.Schwartz. Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. Nature 287, 861-863, 1980.
- SCHENDEL, P.F. & P.E. Robins. Repair of O<sup>6</sup>-methylguanine in adapted Escherichia coli. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 75, 6017-6020, 1978.
- SETLOW, R.B. Repair deficient human disorders and cancer. Nature 271, 713-717, 1978.
- SETLOW, R.B. & W.L.Carrier. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. Biochem. 51, 226-231, 1964.
- SKLAR, Robert. Enhancement of nitrosoguanidine mutagenesis by chloramphenicol in Escherichia coli K-12. J.Bacteriol. 136, 460-462, 1978.
- SMALL, G.D., J.K.Setlow, J.Kooistra & R.Shapanka. Lethal effect of mitomycin C on Haemophilus influenzae. J. Bacteriol. 125, 643-654, 1976.
- SNAPKA, R.M. & B.M.Sutherland. Escherichia coli photo-reactivating enzyme: purification and properties. Biochem. 19, 4201-4208, 1980.
- SPIZIZEN, J. Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate. Proc.Natl.Acad.Sci(USA) 44, 1072-1078, 1958.
- STENT, G.S. & R.Calendar. Molecular Genetics - An introductory narrative. 2<sup>a</sup> ed., São Francisco, W.H. Freeman and Company, 1978, pg. 177.

- STRIKE, P. & R.J. Roberts. Resident enhanced repair: novel repair process action on plasmid DNA transformed into Escherichia coli K-12. J.Bacteriol. 150, 385-388, 1982.
- SUTHERLAND, B.M. & S.G.Hausrath. Multiple loci affecting photoreactivation in Escherichia coli. J.Bacteriol. 138, 333-338, 1979.
- SZYBALSKI, W. Special microbiological systems. II. Observations on chemical mutagenesis in microorganisms. Ann. N.Y.Acad.Sci. 76, 475-489, 1958.
- TAIT, R.C., A.L.Harris & D.W.Smith. DNA repair in Escherichia coli mutants deficient in DNA polymerases I, II, and/or III. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 71, 675-679, 1974.
- TRGOVCEVIC, Z., D.Petranovic, M.Petranovic & E. Salajsmic. recA gene product is responsible for inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis after ultraviolet irradiation. J.Bacteriol. 143, 1506-1508, 1980.
- VON WRIGHT, A. & B.A. Bridges. Effect of gyr-B mediated changes in chromosome structure on killing of Escherichia coli by ultraviolet light: experiments with strains differing in deoxyribonucleic acid repair capacity. J.Bacteriol. 146, 18-23, 1981.
- WEAVER, J. & M.Tomasz. Reactivity of Mitomycin C with synthetic polyribonucleotides containing guanine or guanine analogs. Biochim.Biophys.Acta, 697, 252-254, 1982.
- WITKIN, Evelyn M. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli. Bact.Rev. 40, 869-907, 1976.
- YAMAGISHI, J.-I., Y.Furutani, S.Inoue, T.Ohue, S. Nakamura & M.Schimizu. New nalidixic acid resistance mutations related to deoxyribonucleic acid gyrase activity. J. Bacteriol. 148, 450-458, 1981.

YAMAMOTO, Y., M.Katsuki, M.Sekiguchi & N.Otsuji. Escherichia coli gene that controls sensitivity to alkylating agents. J.Bacteriol. 135, 144-152, 1978.

ZAMENHOF, Patrice J. On the identity of two bacterial mutator genes: effects of antimutagens. Mutat.Res.7, 463-465, 1969.

ZIMMERMANN, Friedrich K. Genetic effects of nitrous acid. Mutat.Res.39, 127-148, 1977.

COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

01

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PARCIAL DE SEIS MUTANTES DE E. coli K-12 RESISTENTES A MITOMICINA C.

I. F. MUNGUBA & A. M. AQUINO

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. CP 1065 - Fortaleza - CE 60.000

Com o objetivo de contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos de reparo de DNA, os quais parecem estar diretamente relacionados com os processos de carcinogênese e envelhecimento celular, utilizamos a cepa CSH57A de E. coli K-12 ( $F^-$ ,  $Leu^-$ ,  $Pro^-$ ,  $Hyx^-$ ,  $Trp^-$ ,  $His^-$ ,  $Arg^-$ ,  $Ile^-$ ,  $Met^-$ ,  $Ara^-$ ,  $Lac^-$ ,  $Mal^-$ ,  $Gal^-$ ,  $Mtl^-$ ,  $Xyl^-$ ,  $Str^F$ ,  $Mcr^R$ ) obtida do "Cold Spring Harbor Laboratory", com a finalidade de isolar e caracterizar mutantes resistentes ao agente alquilante Mitomicina C.

Uma cultura noturna de CSH57A diluída 1:100 v/v em "Penassay Broth" (P.B.) Difco foi incubada a 37°C, sob agitação, até atingir a densidade de  $2 \times 10^8$  células viáveis/ml. As células foram lavadas com 20 ml de tampão fosfato (T.F.) 0,067M, pH 7,0, ressuspensas em T.F. com a mesma densidade e tratadas por 1 µg/ml de Mitomicina C, sob agitação, a 37°C, por 35 minutos. Após este tratamento que reduz a viabilidade a 10%, as células foram lavadas com 20 ml de T.F., transferidas para o mesmo volume de P.B. e incubadas a 37°C, sob agitação, por 2 horas. Em seguida, 0,2 ml de células foram plaqueadas em "Penassay Agar" contendo 10 µg/ml de Mitomicina C para selecionar os possíveis mutantes resistentes ao antibiótico. De 20 placas de Penassay Agar Mitomicina C, seis clones resistentes foram isolados, purificados e caracterizados fenotipicamente através da técnica de "Replica plating" como:  $F^-$ ,  $Pro^-$ ,  $Hyx^-$ ,  $Trp^-$ ,  $His^-$ ,  $Arg^-$ ,  $Ile^-$ ,  $Met^-$ ,  $Ara^-$ ,  $Lac^-$ ,  $Mal^-$ ,  $Gal^-$ ,  $Mtl^-$ ,  $Xyl^-$ ,  $Str^F$ ,  $Mcr^R$ .

Presentemente estamos concluindo as determinações de suas curvas de sobrevivência à Mitomicina C, Ácido Nitroso, Ultravioleta, Nitrosoguanidina e Calor (52°C), visando selecionar aqueles ou aqueles que possam apresentar mutações originais a fim de serem mapeados geneticamente.

(U.F.C. - CNPq)

## B

## BIOLOGIA MOLECULAR

## RESUMOS BI - B3

## B1

FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO ESPONTÂNEA E MUTABILIDADE INDUZIDA POR ULTRAVIOLETA E MITOMICINA C DE MUTANTES DE *E. coli* K-12 RESISTENTES A MITOMICINA C.

A.M. Aquino &amp; I.F. Munguba

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal, 1065 60.000 - Fortaleza, Ceará

Mutantes de *E. coli* K-12 resistentes ao agente alquilante bi-funcional Mitomicina foram isolados a partir da cepa CSH57A (F<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Pro<sup>-</sup>, Hyx<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Arg<sup>-</sup>, Ile<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Mal<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, Xyl<sup>-</sup>, Str<sup>R</sup>, Mcr<sup>S</sup>) obtida do "Cold Spring Harbor Laboratory". Com o objetivo de caracterizar fenotipicamente estes mutantes as frequências de mutação espontânea dos mesmos para as reversões Trp<sup>-</sup>Trp<sup>+</sup> e His<sup>-</sup>His<sup>+</sup>, foram determinadas de acordo com a equação

$$M = \frac{N - N_0}{\ln(p/p_0)}$$

onde "N" representa a proporção inicial de mutantes "p" o número inicial de células, e o "N" a proporção de mutantes viáveis após o número total de células viáveis ter atingido o valor "p".

Determinamos também as mutabilidades His<sup>-</sup>His<sup>+</sup> induzidas por Ultravioleta e Mitomicina C definida como a proporção de mutantes viáveis e o número de células viáveis após cada tratamento indutor. As frequências de mutação espontânea Trp<sup>-</sup>Trp<sup>+</sup> de CSH57A e dos mutantes AA101, AA201, AA203, AA204, AA205, e AA206 não apresentam diferenças significativas, enquanto que em relação à frequências de mutação espontânea His<sup>-</sup>His<sup>+</sup> também não encontramos diferenças significativas entre mutantes e controle, exceto para os mutantes AA201 e AA202, cujos valores são aproximadamente de e duas vezes respectivamente mais elevados do que CSH57A. São também discutidos os valores das mutabilidades His<sup>-</sup>His<sup>+</sup> induzidas por Ultravioleta e Mitomicina C quando determinadas em "Spizizen Agar" sem histidina e em "Spizizen Agar" contendo 0,8 µg/ml de histidina.

Auxílio Financeiro: CNPq e CAPES.