

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

**ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE
MECANISMOS DE REPARACION DE
ADN Y MEMBRANA BACTERIANA**

CARLOS JOSE QUINTANS

-1978-

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología, perteneciente al Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Director de tesis

Dr. Luis V. Orce

Padrino de tesis

Prof. Dr. Oscar Grau

Mi agradecimiento

A los Doctores

Luis V. Orce

Oscar Grau

Dora N. Antón

Al personal del Laboratorio de Microbiología,
Departamento de Radiobiología , CNEA .

Por el inestimable apoyo recibido durante la
realización de este trabajo .

Mi reconocimiento

A la Comisión Nacional de Energía Atómica

Por haberme brindado los recursos e instalaciones
necesarios para efectuar el presente trabajo .

A mi familia

INTRODUCCION

I). Presentación.

II). Envoltura de las bacterias Gram negativas; estructura y funciones.

III). Efectos de las radiaciones sobre las bacterias, mecanismos de reparación.

IV). La membrana citoplasmática y el daño por radiaciones.

V). Características de Salmonella typhimurium DA82

Lista de abreviaturas:

Caf o CAF: cloranfenicol

NaI : ácido nalidíxico

F.A.: 2-fenil etanol

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

LPS: lipopolisacárido

RIL: recuperación por incubación en medio líquido

SIN: medio M9 (142) diluido al 20%

SIN-g: SIN con 0,1 % p/v de glucosa

CON: M9 diluido al 20% y adicionado de 0,1 m NaCl.

CON-g: CON adicionado de 0,1% p/v de glucosa

U.V. : Ultravioleta

D.O.: Densidad óptica

I). Presentación

La membrana citoplasmática interviene en una serie de importantes funciones celulares. Entre ellas la permeabilidad, el transporte de electrones y los procesos de producción de energía, la síntesis de diversas macromoléculas, la replicación del ADN, y la división celular, son algunas de las actividades que aparecen relacionadas a esta estructura.

Una serie de evidencias permiten inferir que la membrana podría estar relacionada también con los mecanismos que llevan a cabo la reparación del ADN.

El motivo del presente trabajo fue explorar las posibilidades que ofrecía la cepa DA82 de Salmonella typhimurium (1) como modelo para investigar la existencia de esas relaciones, ya que puede ser alterada en forma reversible con solo variar la osmolalidad del medio.

El trabajo experimental realizado tuvo por objeto, en una primera parte, ampliar los conocimientos sobre las disfunciones que la osmolalidad del medio provoca en la envoltura de esta cepa. Posteriormente, esta información sirvió de base para el estudio del comportamiento de DA82 frente a las radiaciones.

II). Envoltura de las bacterias Gram negativas; estructura y funciones

La envoltura de las bacterias Gram negativas está compuesta por tres capas diferentes: la membrana citoplasmática, el complejo de mureína y lipoproteína, y la membrana ~~externa~~ externa. Estas dos últimas capas son consideradas frecuentemente como un conjunto, que se denomina "pared celular" (1a).

La membrana citoplasmática es similar a otras membranas biológicas, en su constitución intervienen fosfolípidos y proteínas; estos componentes se disponen formando una estructura que responde a lo que Robertson definió como "unidad de membrana" (2). Se han aislado de esta capa diversos fosfolípidos (3, 17), pero la mayor proporción corresponde a sólo tres componentes, estos son: fosfatidil etanolamina, fosfatidil glicerol, y cardiolipina, que representan el 60%, el 32%, y el 7% respectivamente del contenido total (4).

Estos compuestos, además de su importancia como elementos estructurales, son imprescindibles para la actividad de diversas enzimas relacionadas a esta capa (5).

Por otra parte, se estima que la membrana citoplasmática contiene cerca de 100 proteínas diferentes (6). Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se ha podido resolver un número de bandas que corresponde aproximadamente a dicha estimación (4, 7, 8, 9), pero hasta el momento, sólo unas pocas de esas bandas han podido ser identificadas o relacionadas a una función conocida (10, 11, 12).

Esta membrana constituye una eficaz barrera de permeabilidad capaz de excluir a muchas sustancias (13). Sin embargo, algunas pueden penetrarla a través de mecanismos específicos de transporte (14). Esta propiedad permite retener dentro del citoplasma a las moléculas que son recolectadas por dichos mecanismos, así como también a muchos metabolitos intermedios (15).

De esta forma la célula puede acumular los materiales que necesita, aún en contra de un elevado gradiente de concentración, y mantener su balance osmótico frente a las variaciones del medio (16)

El control de la permeabilidad es tan sólo una parte de las funciones relacionadas a la membrana citoplasmática; esta estructura sirve también de soporte a una serie de procesos de singular importancia para la vida celular, pues provee un ambiente adecuado para la organización y funcionamiento de una variedad de enzimas y complejos multienzimáticos (1a, 2, 13, 14, 18, 19 y 21). Así es que, los mecanismos de respiración y producción de energía están asociados a la cara interna de esta membrana (24), y también depende de ella la replicación del ADN (25).

Finalmente, cabe destacar la importancia que reviste esta capa para el resto de la envoltura, pues en ella se sintetizan las proteínas que la componen (23), así como también los fosfolípidos (18, 19 y 20), el lipopolisacárido (20 y 21), y las unidades fundamentales de la estructura de la mureína (20, 22).

Situada externamente respecto de la membrana citoplasmática se encuentra la capa de mureína-lipoproteína (23). La mureína es un glucopéptido, en su composición intervienen largas cadenas lineales que contienen residuos alternados de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico y puentes que las relacionan formados por dos tetrapéptidos unidos entre sí y al ácido murámico mediante enlaces peptídicos (26).

En E. coli (27), y posiblemente en Salmonella (28), el tetrapéptido contiene l-alanina, ácido d-glutámico, ácido mesodiaminopimélico y d-alanina. Esta estructura configura una gran molécula que tiene la particularidad de crecer junto con la bacteria (23), y que cuando se la aísla mantiene la forma del organismo de origen (29). Cuando las bacterias son tratadas con lauril sulfato de sodio en caliente, la mureína se obtiene como una bolsa taponada

de gránulos de proteína (30); la naturaleza de estos gránulos fue extensamente estudiada por el grupo de Braun (27, 31, 32, 33), estos autores determinaron que la proteína que aparece unida al glucopéptido de E. coli tiene un peso molecular cercano a 7.000, y es una larga cadena de unos 12 nm de longitud, en uno de cuyos extremos aparece unido en forma covalente un componente lipídico que contiene principalmente ácido palmítico.

Se ha demostrado que esa lipoproteína aparece libre en el espacio periplásmico cuando recién se sintetiza, y sólo en un segundo paso se relaciona con la mureína uniéndose por covalencia a los residuos de ácido diaminopimélico (34, 42), esa unión es muy sensible a la acción de la tripsina (27).

Esta capa es considerada como la principal responsable del mantenimiento de la rigidez y estabilidad de la envoltura (29, 35, 36). La membrana citoplasmática parece estar en estrecho contacto con ella, esto se debería en primer lugar a la existencia de áreas de adhesión entre ambas estructuras (37, 39, 40). Dichas áreas, que pueden observarse claramente en células plasmolizadas, son por el momento de naturaleza desconocida.

En segundo término debe considerarse el efecto de la presión de turgencia, ésta empujaría a la membrana contra la mureína y sería otro factor de cohesión entre ambas estructuras (2).

El complejo de mureína y lipoproteína está íntimamente relacionado a la membrana externa, a tal punto que muchos autores consideraban a ambas capas como una sola, identificándolas con la pared celular (1a, 2). Existen evidencias de que las moléculas de lipoproteína se orientan en forma radial extendiéndose hacia la membrana externa y relacionándose estrechamente a ésta (23), posiblemente a través de interacciones hidrofóbicas (38), y sirviéndole de anclaje. El tratamiento con tripsina de envolturas celulares

la lipoproteína y la mureína, de tal manera que la envoltura se separa en dos capas (27). Otro posible rol de la lipoproteína, además de soportar la membrana externa, es el de servir para mantenerla a una distancia fija y determinada de la membrana citoplasmática (23).

La membrana externa, si bien en cortes ultrafinos observados por microscopía electrónica presenta una apariencia similar a la de la membrana interna (2), difiere notablemente de ella en otros aspectos (41). En su composición, además de fosfolípidos y proteínas, interviene un integrante exclusivo de esta capa: el lipopolisacárido (2). Los fosfolípidos son los mismos que aparecen en la membrana interna, pero difieren en la proporción en que se encuentran. El lípido predominante es la fosfatidil etanolamina que representa entre el 85 y el 90 por ciento del total de fosfolípidos, el resto corresponde a fosfatidil glicerol, y a una pequeña cantidad de cardiolipina (4).

Con respecto a los componentes proteicos, esta capa tiene la característica de contar con unas pocas especies diferentes que se hallan en una elevada proporción (43, 44). Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida Ames (7), determinó que cerca del 80 % de las proteínas de la membrana externa de Salmonella typhimurium se distribuyen en cuatro bandas a las que denominó 33 K, 34 K, 35 K, y 36 K, de acuerdo a su peso molecular aparente.

El lipopolisacárido (en adelante LPS) de Salmonella se compone de una cadena compleja de polisacárido unida covalentemente a un lípido, denominado lípido A, que contiene glucosamina, fosfato y ácidos grasos (45). El polisacárido consta de una porción central y de cadenas laterales; estas últimas constituyen el antígeno periférico "O" y en Salmonella typhimurium están formadas por unidades repetitivas del polisacárido ramificado abecuosil-manosil-ramnosil-galactosa (20).

La estructura fundamental de la membrana externa está dada por una doble capa formada por fosfolípidos (17). Las proteínas que en general parecen ser extremadamente hidrofóbicas (23), se unen a esta capa a través de interacciones con las cabezas polares y con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

El lipopolisacárido forma también parte integral de esta estructura a la que se relaciona mediante dos mecanismos diferentes; el primero es a través de interacciones iónicas e hidrofóbicas con las otras moléculas de la membrana; el segundo mecanismo implica la unión mediante cationes divalentes a otras moléculas de LPS (46).

Las moléculas de LPS ligadas de esta última forma son liberadas por tratamiento con EDTA (53). Se postula que el LPS se dispondría sólo en la cara externa de esta membrana, con el polisacárido sobresaliendo de la estructura básica. Quienes sostienen esta hipótesis (46), argumentan que la longitud de las cadenas laterales, que alcanza a 500 Å, no permitiría la ubicación del LPS en la cara interna por falta de espacio suficiente.

La membrana externa se comporta como un tamiz molecular que resulta completamente impermeable a compuestos hidrofílicos de peso molecular superior a 1000 (47, 48). El pasaje de moléculas más pequeñas se realiza a través de poros o canales en cuya formación intervienen algunas de las proteínas mayoritarias de esta capa (49, 50, 51). Además, la membrana externa parece cumplir un rol más específico en la permeabilidad, puesto que contiene varias proteínas implicadas en el transporte de vitamina B-12, hierro y maltosa (52).

Si bien la continuidad básica necesaria para producir una barrera está dada por la tendencia de los fosfolípidos a formar una bicapa, el LPS constituye también una parte muy importante de esa barrera. Una mutación que acorta la cadena del polisacárido, liberando una parte del LPS por tratamiento con EDTA, no

lugar a un aumento de la penetrabilidad de la membrana externa (46, 53), y exponen sitios sensibles a la acción de fosfolipasas (54). Cuando se pierde la continuidad de la membrana externa, ya sea por causas de origen genético (55, 56, 57), o debido a ciertos tratamientos (58, 59), se liberan al medio una serie de enzimas hidrolíticas y proteínas de asociación. Estas proteínas provienen de un compartimiento, denominado espacio periplásmico (23), que está limitado hacia el interior por la membrana citoplasmática y hacia afuera por la membrana externa; esto implica una superposición entre este espacio y el complejo muréina-lípro proteína (60).

El espacio periplásmico refleja, posiblemente, la necesidad biológica de disponer fuera del citoplasma a una serie de productos potencialmente peligrosos para la integridad celular, como lo son las enzimas hidrolíticas (23, 61). Por otra parte, el hecho de que bacterias privadas de las capas externas de la envoltura puedan respirar y transportar aminoácidos (62), sugiere que si bien en la zona periplásmica se encuentran una serie de compuestos que permiten a la membrana interna disponer de un ambiente propicio cuando las bacterias se encuentran en un medio adverso; estas estructuras no son imprescindibles cuando las bacterias son incubadas en un medio favorable desde el punto de vista osmótico y metabólico.

III). Efecto de las radiaciones sobre las bacterias, mecanismos de reparación.

Las bacterias poseen cierta aptitud para sobrellevar los efectos letales y mutagénicos de diversos agentes capaces de producir daños y alteraciones en su material genético. Esta capacidad se atribuye principalmente a la existencia de mecanismos enzimáticos de reparación (63). Dichos mecanismos actúan sobre el ADN dañado dando lugar a reacciones que varían según la naturaleza del defecto, y que en general llevan a la remoción de la lesión o producto ofensivo (64).

Los procesos de reparación más estudiados y conocidos son los que actúan sobre las lesiones causadas por la luz ultravioleta, y por radiaciones ionizantes, especialmente X y Gamma (65).

La radiación ultravioleta comprende longitudes de onda entre 40 y 4000 Å. (66). Para nuestros fines la zona de mayor interés es la llamada ultravioleta lejano, y abarca de 2000 a 3000 Å aproximadamente. Los mayores efectos biológicos se manifiestan a 2600 Å, esa longitud de onda corresponde a la máxima absorción del ADN, que es considerado el blanco más importante para los efectos letales de esta radiación (67). Por razones prácticas la longitud de onda más utilizada es de 2537 Å, ya que puede obtenerse fácilmente y con un alto grado de pureza utilizando una lámpara de mercurio de baja presión (66, 67). La región denominada ultravioleta cercano, que incluye longitudes de onda de 3000 a 4000 Å, resulta también de interés. En esta región se manifiestan los fenómenos de fotoreactivación (68), que serán considerados más adelante.

Los componentes del ADN más afectados por la radiación ultravioleta son las pirimidinas, ya que resultan modificadas con una efectividad diez veces mayor que las purinas (69). La lesión más significativa es la dimerización de dos pirimidinas adyacentes. En este proceso las bases se relacionan mediante dos uniones carbono-carbono, una

entre las posiciones 5, y la otra entre los carbonos 6, de esa manera se crea un anillo de ciclobutano entre las dos pirimidinas (70).

Esto lleva a la ruptura de las uniones hidrógeno con las bases complementarias y a la deformación de la cadena del ADN (71).

El dímero formado más frecuentemente es el de timina-timina en segundo lugar el de timina-citosina, y finalmente el dímero citosina-citosina (71). La importancia biológica de estos fotoproductos se refleja en la disminución de la sobrevivencia de las bacterias y de la actividad transformante del ADN cuando se incrementa el contenido de dímeros (67,72). Por el contrario, estas actividades se recuperan cuando los dímeros son eliminados (73,73a).

Algunos de los daños producidos por ultravioleta, tales como la hidratación de la unión 5-6 de las pirimidinas, son fácilmente reversibles y se los considera de escasa importancia biológica (69). Otros, tales como el corte de una de las bandas del ADN, la producción de entrecruzamientos entre bandas del ADN, y de uniones con otras macromoléculas, se producen con baja frecuencia, y no tienen mayor trascendencia en condiciones normales, sin embargo pueden ser importantes como agentes inactivantes de bacterias que resisten altas dosis de radiación (74).

Si bien los dímeros de pirimidina no son los únicos fotoproductos del ADN, ni explican todos los efectos de la radiación ultravioleta, pueden considerarse la lesión más frecuente e importante. Por este motivo, todos los argumentos acerca de la reparación de los daños producidos por ultravioleta giran alrededor de la remoción de esos dímeros (75).

Los rayos X son producidos por el frenamiento de electrones rápidos mediante materiales de elevado número atómico, mientras que los rayos Gamma se originan en el núcleo, y a menudo acompañan la emisión de partículas Alfa y Beta. Sin embargo, ambas son radiaciones de alta energía, que pueden producir

en su origen producen efectos biológicos semejantes (74). Este tipo de radiación afecta al ADN de dos maneras: por efecto directo a través de la absorción de energía por esta macromolécula, y por efecto indirecto mediante interacciones con el medio (69). En este último caso, el ADN puede recibir energía de otras moléculas que han sido excitadas por la radiación, o bien reaccionar químicamente con los radicales libres formados en el medio (76, 77).

Todos los componentes del ADN son sensibles en mayor o menor grado a las radiaciones ionizantes. Las bases pueden ser alteradas, principalmente a nivel de la unión 5-6 o bien destruidas parcialmente (78). La unión N-glucosídica también es susceptible a la radiación, en este caso el resultado es la liberación de bases intactas (79). Otra consecuencia provocada por las radiaciones ionizantes es la formación de uniones, como en el caso de la radiación ultravioleta, se forman entrecruzamientos entre las dos bandas del ADN, o entre el ADN y otras macromoléculas (74).

Las uniones hidrógeno también pueden ser afectadas dando lugar a la desnaturalización parcial del ADN (78). Sin embargo el daño más importante causado por estas radiaciones es la formación de cortes en la cadena del ADN. Estos cortes se originan como consecuencia de un efecto directo sobre la unión fosfodiéster, o a través de los daños sufridos. De todas maneras el resultado es la ruptura de la cadena y la aparición de un fosfato en la posición 3' ó 5' (74). Cada uno de estos cortes afecta una sola banda del ADN, si dos de ellos coinciden en localizaciones aproximadamente opuestas, aparece un doble corte.

El número de cortes producido por una determinada dosis de radiación sobre ADN aislado, es igual en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (69). Sin embargo, in vivo esta respuesta puede ser modificada por interacción con otras moléculas pudiendo llevar a la producción de diferentes efectos fisicoquímicos de la radiación en presencia o ausencia de oxígeno (69, 74).

De todas las modificaciones producidas en el ADN por las radiaciones ionizantes, los cortes de una sola banda son sin duda las más estudiadas. Esto se debe en parte a que estos cortes son el daño que aparece con mayor frecuencia (74), y además son fácilmente detectables, lo que permite seguir su evolución utilizando métodos simples (80). No sucede lo mismo con otras lesiones, que en sistemas biológicos complejos son de detección dificultosa, y muchas veces imposible (74).

Se conocen por el momento cuatro diferentes mecanismos de reparación. Uno de ellos es muy específico en cuanto al daño que puede remediar, mientras que los otros corrigen una amplia variedad de defectos (63,64,65,75). Aunque se los considerará separadamente, no deben tomarse como sistemas aislados, ya que generalmente actúan en forma complementaria y coordinada (81).

Debe además tenerse en cuenta el hecho de que algunos pasos son compartidos con otras funciones celulares

Si el ADN contiene dímeros de pirimidina, esas lesiones pueden ser reparadas por el mecanismo de foto-reactivación. Este es un proceso altamente eficiente, y ha sido descrito en una variedad de sistemas biológicos (67,68,82). Lo lleva a cabo una enzima que necesita para actuar luz de una longitud de onda cercana a los 360 nm (83). La reacción se completa en tres etapas que se representan en forma esquemática en la figura 1. En primer lugar la enzima forma un complejo con el ADN (1-c), la unión tiene lugar sólo si el ADN contiene dímeros. Este proceso se cumple aún en la obscuridad (82,83,84).

Durante la segunda etapa, que requiere luz foto-reactivante para llevarse a cabo, los dímeros son monomerizados, rompiéndose las uniones que forman el anillo de ciclobutano (1-d) (82,83,85,86).

Finalmente, el proceso se completa con la desaparición del complejo enzima-ADN (1-e) (74,86).

Además de su importancia como mecanismo de reparación, la foto-reactivación es una herramienta útil para comprender los efectos biológicos de la radiación ultravioleta, ya que con su ayuda se puede eliminar alrededor del noventa por ciento de las lesiones de ese origen (64,83,85).

En ausencia de luz foto-reactivante el primer responsable de la remoción de dímeros es el mecanismo de reparación por escisión, también conocido como "reparación oscura". Si bien la mayor parte de la información existente sobre este mecanismo se refiere a su intervención en la remoción de dímeros de pirimidina, este proceso tiene un alcance mucho más amplio; por su intermedio se pueden reparar lesiones de muy diversa índole, y constituye un mecanismo universal para la corrección de defectos en el ADN (63,65,74,75,81,87).

Aparentemente cualquier defecto que cause una distorsión en la estructura del ADN puede ser sustrato para este mecanismo (63,81). El camino seguido para la reparación de la lesión se cumple en cuatro etapas, la figura 2 las muestra en forma esquemática. En una primera etapa la lesión es reconocida, esta misión es cumplida en E. coli por la correndonucleasa II, que es el producto de los genes uvrA y uvrB (88). En otras especies se han encontrado actividades similares (89, 90). Dicha enzima efectúa una incisión en posición 5' con respecto al defecto (2-b), ese corte incluye sólo la banda del ADN que contiene la lesión (88). Este proceso puede ser seguido midiendo la aparición de grupos fosfomonoéster (91), o bien estudiando la velocidad de sedimentación del ADN a través de gradientes alcalinos de sacarosa (73a, 80). Esta última técnica se basa en la desnaturalización del ADN a pH elevado; en estas condiciones los cortes de una sola banda originados por el primer paso de la reparación, dan lugar a la fragmentación de la banda dañada. Esto puede observarse al analizar el gradiente, reflejándose como una disminución de la distancia media de sedimentación.

Cuando se realizan estos ensayos en sistemas "in vitro", se pueden observar cortes en número proporcional al de lesiones (63). No ocurre lo mismo "in vivo", en este caso el proceso de reparación continúa y los cortes desaparecen, debido a esto solo es posible observar unos pocos cortes por cromosoma (63, 73a).

Se han aislado mutantes incapaces de llevar a cabo el primer paso de la reparación por escisión; ese defecto provoca un aumento de la sensibilidad a las radiaciones, y al analizar el ADN en gradientes alcalinos de sacarosa no se observa la formación de cortes (73a,88).

Las endonucleasas de reparación llevan a cabo solamente la etapa de incisión, y son incapaces de liberar nucleótidos, ni aún aquellos que han sido dañados fotoquímicamente (63,81). Este proceso es llevado a cabo en una segunda etapa denominada escisión, y es catalizado por enzimas exonucleolíticas (63, 75, 81, 89); que se encargan de "limpiar" la lesión y su zona adyacente.

No cualquier exonucleasa puede cumplir esa función, ya que el sitio donde se efectuó la incisión impone la dirección de la hidrólisis, que debe ser de 5' a 3' (63, 75). Otra restricción surge de la necesidad de actuar sobre funciones fosfodiester penúltimas, de otra manera la hidrólisis se detendría al llegar a un nucleótido terminal modificado (63, 75).

Se han aislado dos tipos de enzimas que cumplen esos requerimientos, en un caso la actividad 5'-3' exonucleasas se manifiesta en forma independiente, en el segundo tipo aparece asociada a la actividad ADN-polimerasa tipo I (63, 75, 81).

En general se atribuye a esta última enzima la responsabilidad de llevar a cabo la escisión, sin embargo no existen pruebas concluyentes acerca de la exclusividad de esta función (63, 75, 92, 93, 94, 95, 96).

El proceso de escisión puede ser puesto en evidencia siguiendo la desaparición de las lesiones, esto es en general sumamente difícil, pero los dímeros de pirimidina constituyen una excepción. Estos fotoproductos se forman en cantidades relativamente grandes por irradiación ultravioleta, son resistentes a tratamientos que hidrolizan el ADN, y se pueden separar de las bases no alteradas utilizando métodos cromatográficos simples (69,71,74,97,98).

Luego de completada la exonucleólisis (2-c) queda en el lugar de la lesión una zona con ADN de una sola banda, su replicación para dar un ADN de doble banda constituye la tercera etapa de la reparación por escisión (63,64,71). Se cree que bajo condiciones normales, esta etapa (2-d) se lleva a cabo simultáneamente con la anterior, siendo ambas catalizadas por la polimerasa I, gracias a la habilidad de esta enzima para actuar al mismo tiempo como 5'→3' polimerasa y 5'→3' exonucleasa. (63,75).

La actividad de 5'→3' polimerasa parece no ser imprescindible, ya que los mutantes pol A son capaces de efectuar reparación por escisión (63,94,95). En este caso la responsable de la replicación reparadora sería la polimerasa III (63,99). Sin embargo, en los mutantes pol A el proceso se lleva a cabo con menor eficiencia; este hecho se manifiesta como un aumento de la sensibilidad de los mismos frente a las radiaciones (63,94,95).

Una vez completada la polimerización queda un corte en la banda reparada (2-d). El sellado de ese corte constituye la cuarta y última etapa de la reparación por escisión, este paso es llevado a cabo por la polinucleótido ligasa (100,101,102,103). La actividad de esta enzima, que requiere la presencia de NAD (104), da como resultado la soldadura del corte mediante la formación de una unión fosfodiéster. Las bacterias con defectos en este paso cumplen, luego de ser irradiadas, las etapas previas de la reparación, pero no la completan.

El resultado es la acumulación de cortes en su ADN (105), y una mayor sensibilidad a las radiaciones (106,107). Este defecto puede ser detectado por ultracentrifugación en gradientes alcalinos de sacarosa (105).

Ciertas lesiones podrían ser eliminadas sin transponer todas las etapas de la reparación por escisión. En bacterias tratada con radiaciones ionizantes se postula la reparación ultra-rápida o "tipo I" (108). Este proceso, que actuaría únicamente sobre ciertos cortes de una sola banda, se cumpliría muy rápidamente (2 minutos) aún a 0° C. La reparación ultra-rápida se llevaría a cabo con el solo concurso de la polinucleótido ligasa. Este mecanismo actuaría más eficientemente sobre los cortes producidos en anoxia. Esto se atribuye a que la presencia de oxígeno daría lugar a la aparición de cortes de distinta naturaleza química que aquellos formados en anoxia (108,109). La reparación de los cortes remanentes luego de la actuación del mecanismo ultra-rápido también implica el uso parcial de la reparación por escisión.

Dada la naturaleza de la lesión, la etapa de incisión es innecesaria (110), y la reparación comienza a partir del ataque exonucleolítico. Este proceso de escisión abreviada se conoce como "reparación rápida" o "tipo II" (108,109,111).

La reparación por escisión es un mecanismo muy eficiente pero solo puede actuar antes de la replicación de la zona dañada. Por este motivo, los cromosomas que no se están dividiendo son reparados en forma más completa. Una consecuencia de esta propiedad es la llamada "recuperación por incubación en medio líquido" (en adelante RIL) (112). Este fenómeno aparece si las bacterias con su ADN dañado son incubadas en medio no nutritivo, y se manifiesta como un aumento de la viabilidad que, dentro de ciertos límites, depende del tiempo de incubación (112).

Cuando el cromosoma bacteriano ha sido muy dañado la replicación se detiene. Sin embargo, este proceso puede continuar si existen pocas lesiones, o si parte de ellas fue reparada previamente (113). En este caso el producto de la replicación es un ADN que presenta discontinuidades en las cadenas hijas (114). Estas discontinuidades corresponden a las regiones opuestas a las lesiones (fig. 3), y se producen debido a que la presencia de bases alteradas y otros defectos originan zonas no codificantes (115). Por otra parte, el ADN formado por la replicación de la banda inicialmente opuesta a la lesión no presentará anomalías (113).

El ADN con defectos en las dos bandas puede ser reparado si la bacteria tiene una capacidad normal de recombinación. Por medio de un mecanismo denominado "reparación post-replicativa" o "reparación por recombinación", se puede efectuar un intercambio entre la doble cadena sana y la defectuosa (fig 3), que da como resultado la remoción de la lesión (63,113,114,115). Cuando este mecanismo opera sobre las lesiones producidas por radiación ionizante, se lo conoce también como "reparación lenta" o "tipo III". Es poco probable que este mecanismo repare los cortes simples producidos por esa radiación, eso se debe a que la replicación de la región lesionada daría lugar a un corte de doble banda que es en general irreparable; sin embargo, con muy pocos cortes se podría esperar que se rearme al menos un cromosoma sano (109). Además, este mecanismo puede ser de importancia para la reparación de los otros daños producidos por radiación ionizante. Esto se hace evidente porque las bacterias capaces de efectuar recombinación son más resistentes frente a esa radiación (113).

Resulta obvio que para el cumplimiento de este proceso las bacterias deben dividirse, la incubación en un medio sin nutrientes o el agregado de inhibidores evita la expresión de la reparación por recombinación (116).

5

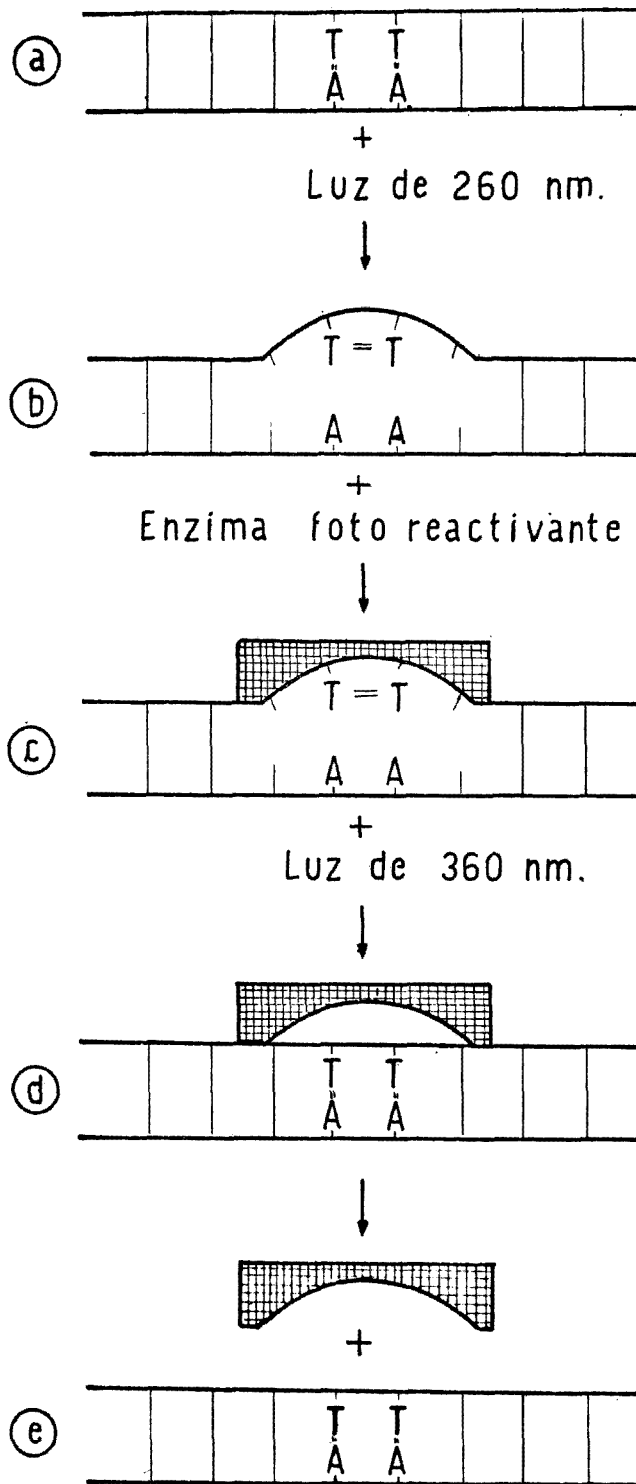
Con cierta probabilidad pueden introducirse en un ADN dos lesiones cercanas y ubicadas en bandas opuestas (fig 4). En este caso la reparación por escisión o recombinación es imposible, dado que ninguna de las dos bandas tiene propiedades codificantes en la región lesionada. Se han encontrado evidencias de que frente a esta situación actuaría otro mecanismo, denominado "reparación de emergencia" (81); básicamente este sería un mecanismo de escisión, pero tendría la capacidad de replicar ADN sin necesitar de una cadena complementaria intacta. No se conoce por el momento la enzima que cumpla esta función, pero se supone que podría tratarse de una polimerasa aún no aislada, o bien de una proteína que podría unirse a la pol I modificando sus propiedades (117,118).

Una vez que una de las lesiones ha sido reparada por este proceso de emergencia (fig 4), la opuesta puede ser sometida sin inconvenientes a mecanismos de escisión o recombinación (81).

Es evidente que una propiedad de este mecanismo es la alta probabilidad de originar una mutación. Se ha encontrado que bacterias deficientes en la reparación de emergencia pierden la capacidad de ser inducidas a mutar mediante radiaciones (81,117).

Otra propiedad de este proceso es la de ser inducible, y no tener lugar en ausencia de síntesis de proteínas (117).

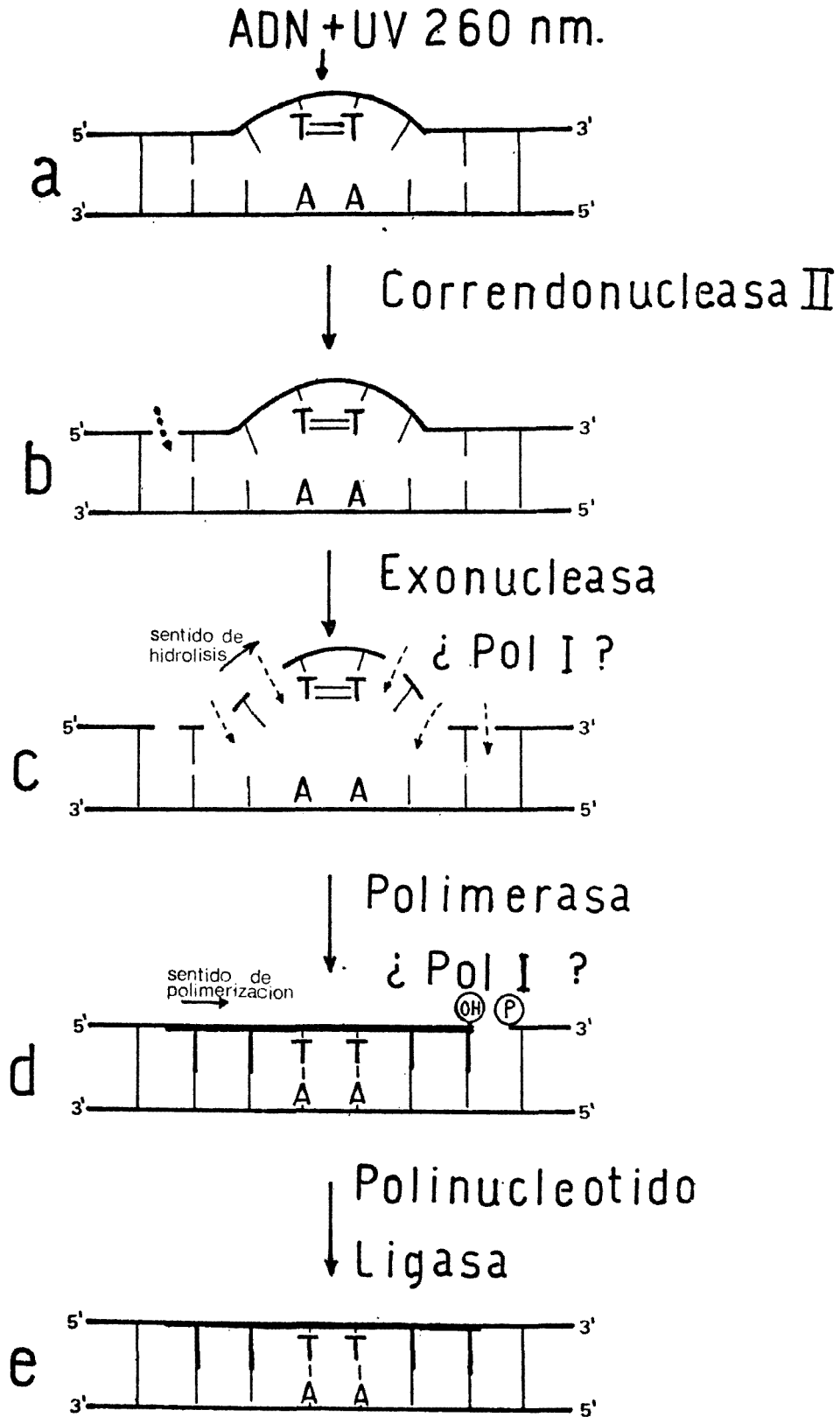
Foto-reactivación *



* Según Witkin (81)

fig. 1

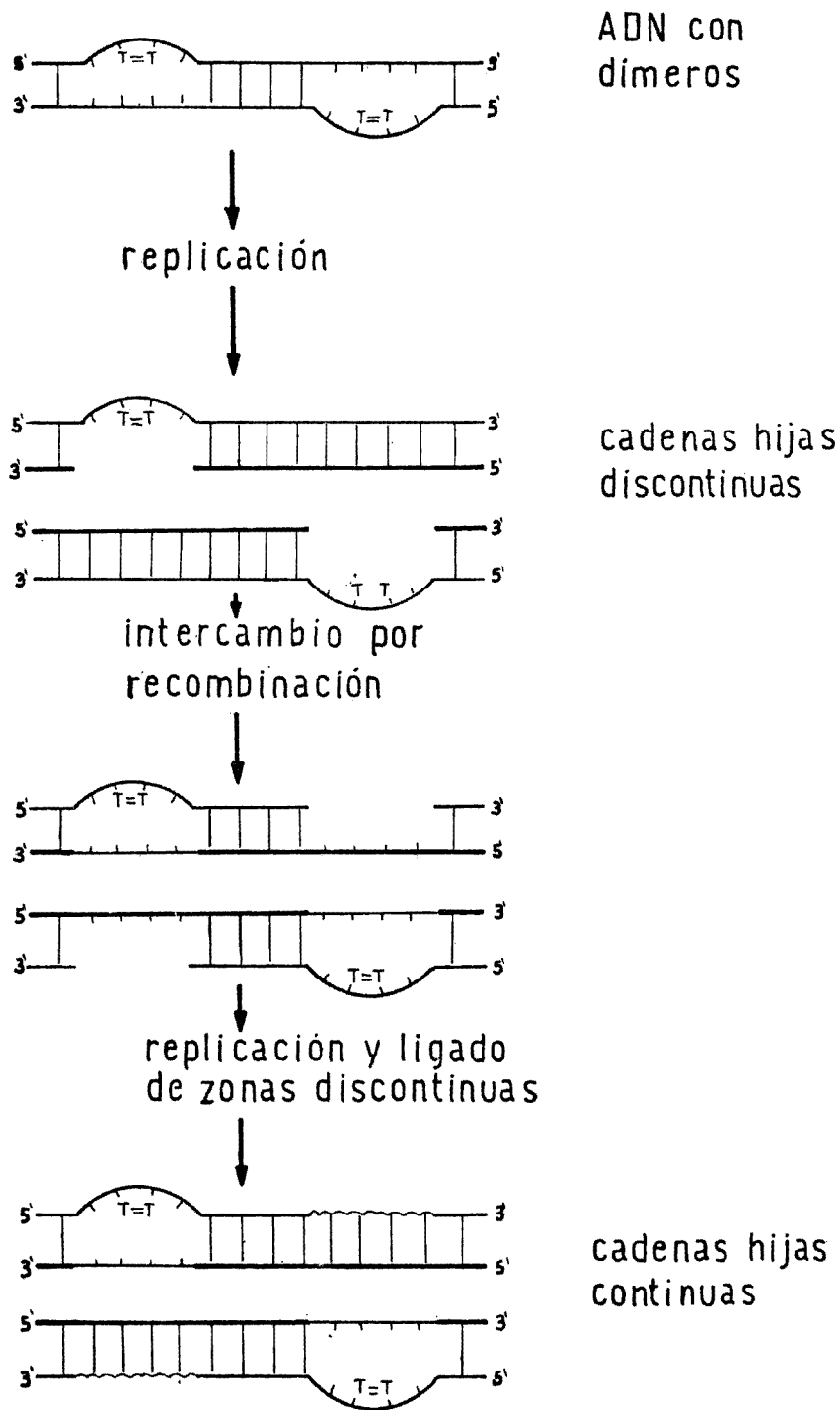
Reparacion por escisión *



* Según Witkin (81)

fig. 2

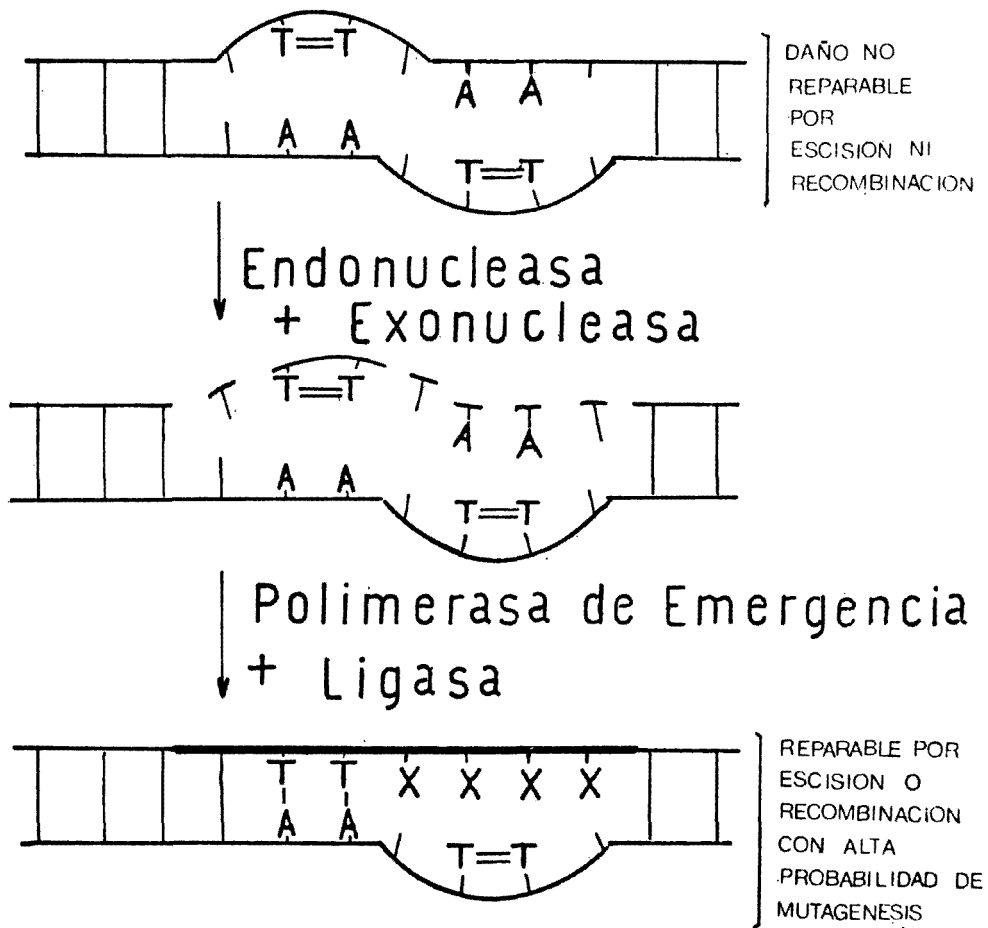
Reparación por recombinación *



* Según Witkin (81)

fig. 3

Reparación de Emergencia *



* Según Witkin(81)

fig. 4

IV). La membrana citoplasmática y el daño por radiaciones

A partir del momento en que el ADN fue identificado como el portador de la información genética, se lo aceptó también como el único blanco significativo para el efecto letal de las radiaciones sobre las células (67,69,74). Como consecuencia de esto, en los últimos 20 años gran parte de los estudios realizados en el campo de la radiobiología se concentraron en explicar los fenómenos observados a nivel celular en base a consideraciones sobre la conformación, composición, y dimensiones del ADN de doble cadena. Sin embargo, algunos autores sugirieron la existencia de por lo menos otro sitio sensible. Este concepto surgió del hecho de que la presencia de oxígeno, que aumentaba notablemente el daño producido al irradiar células enteras, no causaba ningún efecto, o bien mostraba una acción protectora cuando se irradiaba ADN aislado (120,121). Por otra parte, tanto las proteínas como el ARN responden a las radiaciones en forma similar a la observada para el ADN, y por lo tanto no resultan candidatos adecuados para satisfacer las exigencias de un modelo con dos sitios sensibles (125,126).

Basándose en evidencias de naturaleza indirecta surgidas de los resultados obtenidos al irradiar moléculas biológicas aisladas, Bacq y Alexander (122) postularon que la membrana debería ser considerada también como un blanco crítico para el efecto de las radiaciones, y Alpert (123,124) sugirió que en esa estructura residía la principal responsabilidad del efecto radiosensibilizador del oxígeno.

Por otra parte, se realizaron estudios para probar el daño producido por radiación en membranas utilizando lisosomas como modelo. El grado de deterioro de estos elementos puede seguirse midiendo la liberación de las enzimas contenidas en ellos, Watkins (127) encontró que la irradiación en presencia de oxígeno estimulaba el efecto producido por la radiación desde 5 veces, hasta valores demasiado altos para ser medidos con exactitud.

Entre los componentes de las membranas, los lípidos poliinsaturados son particularmente sensibles al daño oxidativo producido por radicales libres originados a consecuencia del tratamiento con radiaciones ionizantes (74). Estudiando las consecuencias de la irradiación sobre los fosfolípidos de *E. coli*, Yatvin y col. (128) encontraron que si bien el contenido de fosfolípidos de las cepas B/r (radioresistente) y B_s-1 (radiosensible) era similar antes de ser expuestas a las radiaciones ionizantes, cuando las bacterias irradiadas eran incubadas ocurrían cambios significativos en la concentración de cardiolipina, siendo mayor (a igual dosis) el aumento producido en la cepa sensible (B_s-1). Los mismos autores (129) comprobaron que la composición de ácidos grasos de la membrana alteraba la sobrevivencia de bacterias irradiadas a distintas temperaturas; este fenómeno fue relacionado al diferente grado de insaturación de los ácidos grasos utilizados.

El concepto de que la membrana de las bacterias constituye un importante sitio sensible a las radiaciones se ha vuelto cada vez más aceptable. Sin embargo, no resulta claro aún si las lesiones radioinducidas en la membrana son directamente responsables de los fenómenos letales, o si necesitan interaccionar con otras lesiones o estructuras antes que sus consecuencias sobre la actividad reproductiva se pongan de manifiesto (119).

Un aspecto que debe tenerse en cuenta es la posible influencia que pueda tener el daño producido a nivel de las membranas sobre el ADN y sus mecanismos de reparación. Es un hecho bien establecido que el ADN se encuentra unido a la membrana citoplasmática, y que el punto de unión es el origen de la replicación del ADN (130)

Al explorar la posibilidad de que este sitio represente en sí un blanco sensible al efecto de las radiaciones, Cramp y col. (131) encontraron que la actividad de los complejos de ADN-membrana medida por su capacidad de sintetizar ADN, es particularmente susce

tible a las radiaciones ionizantes, y que la extensión del daño aumenta en presencia de oxígeno (132), y mientras que con dosis relativamente bajas de radiación ionizante (20 Kr) se puede llegar a una inhibición del 95 %, dosis muy altas de ultravioleta (4000 erg/mm²) son incapaces de inhibir más del 50 % de la capacidad sintetizante. Esto llevó a concluir que, debido a absorción selectiva de la radiación ultravioleta por los ácidos nucleicos a la longitud de onda empleada (254 nm), la radiación ultravioleta era incapaz de afectar la membrana, limitándose su acción sólo a nivel del ADN (132,133).

Burrell y col. (134), estudiando la asociación entre el ADN y la membrana de M. radiodurans encontraron que si bien en bacterias sin irradiar, existen solamente uno o dos puntos de unión entre ambos; en bacterias irradiadas e incubadas cerca de 1 hora aparecían múltiples sitios en los que el ADN se había relacionado con la membrana citoplasmática (134). Estos resultados los llevaron a sugerir que los nuevos complejos formados representaban un intermedio en la reparación del ADN en el que intervendría la membrana citoplasmática.

En la literatura existen ejemplos de pares de cepas isogénicas que difieren solo en una mutación de envoltura y muestran una diferente sensibilidad frente a la radiación ultravioleta (135, 136), dado que esta radiación parece no afectar la membrana; la variación de la sensibilidad podría ser explicada en términos de una diferente capacidad de recuperación originada en algún tipo de relación entre la envoltura y los mecanismos de reparación.

Existen evidencias de que las DNA polimerasas no estarían libres sino unidas a un complejo con la membrana (137). Estas enzimas, además de intervenir en la replicación, parecen ser un factor clave en los procesos de reparación (63). Si existiera una relación entre la actividad de las enzimas que intervienen en la reparación, y la membrana citoplasmática, sería tal vez suficiente para justificar el hecho de que un daño en la membrana producido por las radiaciones ionizantes en presencia de oxígeno, o un cambio en la misma

debido a causas de origen genético, dieran lugar a una considerable variación de la sobrevivencia frente a las radiaciones.

V). Características de Salmonella typhimurium DA82 (1).

Esta cepa posee una mutación que causa diversas anormalidades en funciones relacionadas a la envoltura (1). Como consecuencia de ello, su pared es inusualmente elástica, las células que produce son esféricas en vez de alargadas como en la cepa silvestre, y muestra una mayor sensibilidad a antibióticos que interfieren con la síntesis de mureína, tales como penicilina y cicloserina.

Además, esta cepa presenta alteraciones en su comportamiento osmótico, que dan lugar a la detención de la división, y a una pérdida exponencial de la viabilidad cuando las células son transferidas desde un caldo de osmolalidad normal a caldo con bajo contenido de sales. El agregado de sales o sacarosa para aumentar la osmolalidad hasta niveles normales detiene inmediatamente la muerte, y permite la continuación de la división. La pérdida de la viabilidad es un proceso que requiere crecimiento y síntesis de proteínas, ya que la presencia de cloranfenicol lo detiene. La letalidad no se debe a lisis causada por debilidad de la envoltura, ya que DA82 es capaz de tolerar perfectamente el ser suspendida en agua. Si el choque hipoosmótico se efectúa transfiriendo las células desde un medio mínimo de osmolalidad normal a un medio mínimo diluido, los efectos no son tan drásticos, ya que solamente se detiene el crecimiento sin sobrevenir pérdida de la viabilidad.

Esta cepa fue aislada por D.N. Antón al efectuar cruzamientos por transducción entre la cepa DA78 (his W 1824, OG 203, str A, (P22)) como receptora, y una cepa que llevaba la mutación his O 1242 como donante. La constitución de DA82 es (his W 1824, his O 1242, str A, (P22)), pero debe tenerse en cuenta que las particulares propiedades de este mutante no se deben a la combinación de las mutaciones regulatorias que lleva, ya que se aislaron en forma independiente muchas cepas que llevaban esas mismas mutaciones, pero que no exhibían el fenotipo de DA82. Dicho fenotipo proviene de una mutación

aparecida espontáneamente durante la obtención de los dobles mutantes. El gen afectado, que sería responsable de la forma anormal y de la sensibilidad osmótica, fue denominado BAC (138). Los resultados obtenidos al mapear este gen sugieren una ubicación entre COD y STR. Estos marcadores corresponden a los minutos 104 y 108 del mapa genético de Salmonella typhimurium (139).

Recientemente D.N. Antón ha obtenido (140), por transducciones mediadas por el fago P1, cepas que difieren solo en el alelo del gen BAC. El análisis preliminar de las propiedades fenotípicas de los transductantes bac, indican que esa mutación es responsable del control de la forma celular, la osmosensibilidad, la hipersensibilidad a penicilina y cicloserina. Además esa mutación da lugar a un aumento de la sensibilidad a novobiocina y desoxicolato, y afecta la utilización de ciertos carbohidratos (141).

PARTE EXPERIMENTAL

- I) Generalidades
- II) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la división, el aumento de la masa bacteriana, y la síntesis de macromoléculas.
- III) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la actividad respiratoria.
- IV) Efecto de la osmolalidad del medio sobre el transporte de leucina .
- V) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la actividad de succínico deshidrogenasa
- VI) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la captación de acriflavina .
- VII) Proteínas de la envoltura: análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida .
- VIII) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la sensibilidad a radiación ultravioleta .
- IX) Efecto de la composición del medio sobre la RIL .
- X) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la RIL
- XI) Efecto de los inhibidores de la síntesis de macromoléculas sobre la RIL .
- XII) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la escisión de dímeros de pirimidina .
- XIII) Sedimentación del ADN en gradientes alcalinos de sacarosa.
- XIV) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la reparación por foto-reactivación.
- XV) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la resistencia a radiación Gamma .

I) Generalidades

Las mediciones de densidad óptica se efectuaron con un espectrofotómetro Gilford modelo 2000, provisto de monocromador y fuente de luz Beckman . Se emplearon cubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz , salvo para las de terminaciones de succinico deshidrogenasa que fueron realizadas con cubetas de 3 ml y 1 cm .

Las incubaciones a temperatura controlada y con agitación se llevaron a cabo utilizando un baño agitador rotatorio Aquaterm , de New Brunswick Sci.Co. , regulado a 37°C y 150 giros por minuto .

Para las sedimentaciones a velocidades bajas o medias se utilizó una centrífuga International mod. PR-2 . Como ultracentrífuga se empleó una Spinco, Beckman, modelo L2-50 B.

Las irradiaciones con luz ultravioleta a 2537 Å se efectuaron con una lámpara germicida General Electrics G15-T8 de 15 Watt , instalada en una cabina de madera. La muestra a irradiar se colocaba a unos 70 cm bajo la lámpara, en una base de caja de petri, esterilizada, de 90mm de diametro . El volumen de suspensión celular que se trataba cada vez era de 12 ml. La muestra se homogeneizaba continuamente por medio de una varilla metálica, cubierta de vidrio, que se mantenía en movimiento mediante un agitador magnético. El flujo de radiación a nivel de la muestra era de 6 erg/mm² seg., y se determinó mediante un dosímetro a celula fotovoltaica "Black ray U.V. meter " de Ultraviolet Products Inc. .

Como fuente de irradiación Gamma se utilizó una celula de Co60 Noratom Norcontrol . La dosis se calculó a partir de los datos suministrados por el fabricante, y una curva de decaimiento para Co60 .

Los gradientes de sacarosa se prepararon con un aparato Isco, gradient former mod. 570 , de Instruments Special-

ties Co. Lincoln, Nebraska , y se fraccionaron con una jeringa mecánica Isco gradient fractionator model 182 . Los gradientes se empujaron con sacarosa al 70% utilizando un adaptador de acrílico para no inutilizar los tubos. Los gradientes correspondientes a experimentos de electroforesis fueron controlados durante su fraccionamiento con una celda de flujo Isco UA2 ultraviolet analyzer, a fin de localizar la posición de los picos .

Los tratamientos con ultrasonido se efectuaron empleando un equipo "Biosonik III" de Bonwill Scientific Co. Rochester N.Y., provisto de una punta de titanio de 1/2 pulgada de diametro. El tratamiento se efectuó en forma fraccionada para evitar desnaturalizar el material .

Como fuente de poder para electroforesis se empleó un aparato Vokam modelo SAE 2761 de Shandom Instruments . La celda para electroforesis en placa se construyó en los talleres de la CNEA , utilizando planchas de acrílico de 6 mm de espesor vitrea, y alambre de platino , según lo indicado por Ames (43). Los geles fueron secados con la técnica de Reid y Bielecki (158). La densitometría se efectuó con un equipo Jarrel Ash, ajustando la velocidad de barrido a 10 mm/ min .

Las medidas de radioactividad se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard mod. Tri-carb . Se empleó una solución compuesta por : tolueno, 1 litro, 2-5 difenil oxazol 3 g , y 1,4 bis 2(5 fenil oxazolil) benceno 0,05 g los compuestos radioactivos fueron provistos por New Englar Nuclear.

Las cepas empleadas fueron cedidas por la Dra. D.N. Antón del Laboratorio de Microbiología , Dto. de Radiobiología de la CNEA .

Los experimentos fueron repetidos por lo menos tres veces. Salvo que se indique lo contrario los resultados graficados o tabulados corresponden a un experimento tipo .

II). Efecto de la osmolalidad del medio sobre la división, el aumento de la masa bacteriana y la síntesis de macromoléculas en *Salmonella typhimurium* DA82.

Se empleó para realizar los experimentos medio M9 (142) debido a que su composición permite omitir la fuente de Carbono sin alterar el balance salino del mismo. La ausencia de una fuente de energía es importante para la manifestación de los procesos de reparación estudiados en este trabajo. Por dilución de dicho medio al 20 % (v/v) de su concentración original, se obtuvo una solución de baja osmolalidad (50 mOs), que se denominó SIN-g, y que contenía glucosa al 0,1 % (p/v). Agregando a SIN-g Cloruro de Sodio 0,1 molal se obtuvo un medio que se denominó CON-g, cuya osmolalidad (250 mOs), es similar a la de los medios en los que DA82 se comporta en forma normal (1, 143). Omitiendo la glucosa se obtuvieron dos medios semejantes a los anteriores, pero sin fuente de carbono, que se denominaron SIN y CON respectivamente.

Resultados:

Las bacterias incubadas en CON-g se comportaron normalmente en todos los aspectos analizados (fig 5, fig 6, fig 7a,b y c).

Por el contrario, la incubación en SIN-g dio lugar a la detención de la división (fig 5), frenó el aumento de la masa bacteriana (fig 6), y causó una seria inhibición de la síntesis de macromoléculas. La incorporación de leucina fue la más deprimida (fig 7a), en segundo término la de uracilo (fig 7b), y finalmente la de timidina (fig 7c). Cabe destacar que la incorporación de timidina en SIN-g fue poco afectada durante los primeros 30 minutos, pero fue disminuyendo luego gradualmente hasta hacerse prácticamente nula después de 90 minutos de incubación (fig 7c).

En ausencia de glucosa, se produjo la detención del aumento de la masa bacteriana tanto en las bacterias en CON como en aquellas en SIN' (fig 6). La falta de una fuente de Carbono frenó también la división, pues el número de bacterias viables en CON aumentó sólo ligeramente en el transcurso del experimento mientras que en SIN permaneció invariable (fig 5). La ausencia de glucosa dio lugar también a la detención de la síntesis de macromoléculas, pero con características diferentes según la osmolalidad del medio.

En las bacterias en SIN la incorporación de timidina se detuvo completamente alrededor de los 45 minutos y fue inferior a la observada en SIN-g, mientras que en las bacterias en CON la incorporación continuó, aunque con una tasa deprimida, durante todo el transcurso del experimento (fig 7c). La incorporación de uracilo, también inhibida, siguió un patrón similar en CON y en SIN, pero fue menor en este último caso (fig 7b).

Finalmente, mientras que la incorporación de leucina en SIN se detuvo casi por completo entre los 45 y los 60 minutos, en las bacterias en CON prosiguió, aunque con una velocidad muy baja, durante toda la incubación (fig 7a).

El agregado de NaCl 0,1 m a las bacterias en SIN-g dio lugar a la reanudación de la división y del aumento de la masa bacteriana con una pendiente similar a la de las bacterias en CON-g (fig 5, fig 6). En el caso de las bacterias mantenidas en SIN, cuando se les agregó NaCl 0,1 m no se observó ningún cambio aparente en el número de bacterias, y sólo se produjo una ligera variación en la densidad óptica (fig 6), correspondiente al cambio de volumen que experimentan las bacterias en esta cepa cuando son sometidas a un cambio de osmolalidad (1).

Conclusiones:

La incubación de bacterias de la cepa DA82 en medio SIN-g

da lugar a respuestas similares a las observadas previamente en los medios EG-20 % y caldo sin NaCl (1; 143). Las bacterias incubadas en SIN-g no pierden su viabilidad, como ocurre en caldo sin NaCl, pero al igual que en EG-20 % detienen su crecimiento y división. Al igual que en otros medios, estos fenómenos pueden ser anulados agregando a SIN-g cloruro de sodio 0,1 m.

La incubación en ausencia de fuente de carbono detiene también la división y el aumento de la masa bacteriana.

El perfil de las curvas de incorporación de timidina en las bacterias en SIN-g, sugiere que el paso afectado es la iniciación de la replicación del ADN. La elevada incorporación residual de timidina que tiene lugar, especialmente en SIN-g, podría deberse a la terminación de los ciclos de replicación iniciados antes del cambio de medio. Esto no parece ocurrir en CON, donde la incorporación de timidina no llega a detenerse completamente, tal vez debido a que bajo esas condiciones se observa una considerable síntesis residual de proteínas. En los medios de baja osmolalidad, la incorporación de leucina es leve y se detiene durante la primera hora.

Las muestras de incorporación de uracilo no fueron tratadas con álcali para hidrolizar ADN, por este motivo, los valores reales de síntesis de ARN pueden ser algo más bajos que los obtenidos.

Figuras 5 y 6.

Bacterias de la cepa DA82, creciendo en fase logarítmica, a una D.O.₆₅₀ de 0,6 a 0,8, fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento fue enjuagado y luego resuspendido con M9 al 20 %. La D.O.₆₅₀ de la suspensión se ajustó alrededor de 0,1 (aproximadamente 10^7 bacterias/ml.) y se dividió en 4 alícuotas.

La alícuota denominada SIN se incubó directamente, a la designada SIN-g se le agregó 0,1 % de glucosa. A la alícuota CON se le adicionó NaCl hasta una concentración final de 0,1 m., y a la denominada CON-g se le agregó, además de NaCl 0,1 m., 0,1 % de glucosa.

Se incubó a 37°C con agitación, a los tiempos indicados se tomaron muestras en las que se determinó la D.O.₆₅₀, y el número de bacterias por recuento de colonias en agar nutritivo.

Figuras 7a, 7b y 7c.

Se prepararon suspensiones bacterianas en CON, CON-g, SIN y SIN-g, como se indica en la leyenda de las fig. 5 y 6. Cada una de esas suspensiones fue dividida en 3 alícuotas, a una de ellas se agregó ³H-Leucina (5 μ Ci/ml), a otra ¹⁴C-Uracilo (1 μ Ci/ml), y a la tercera ³H-Timidina (5 μ Ci/ml). Todos los cultivos contenían además: timidina (5 μ g/ml), adenosina (190 μ g/ml), uracilo (9 μ g/ml) y leucina (10 μ g/ml).

Los cultivos fueron incubados por agitación a 37°C; a los tiempos indicados se retiraron muestras de 0,1 ml que se absorbieron en discos de papel Whatman 3MM de 2,5 cm. de diámetro y fueron tratadas según Byfield y Scherbam (144). Para la estimación de la radioactividad se colocaron los discos en el fondo de viales de centelleo, se los cubrió con 5 ml de líquido con base de tolueno, y se contó en espectrómetro de centelleo líquido.

fig. (5) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la división

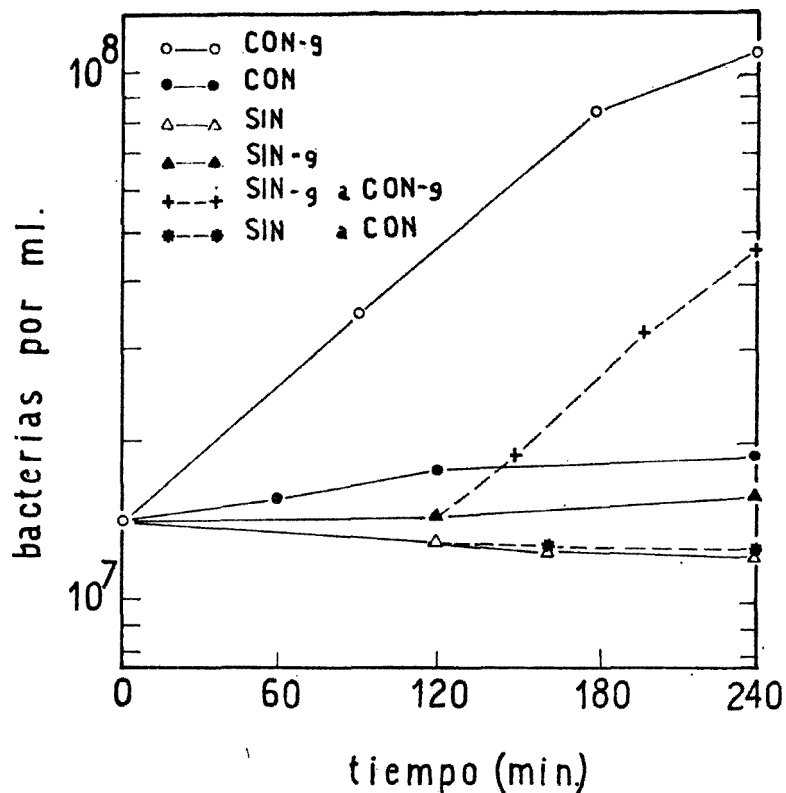
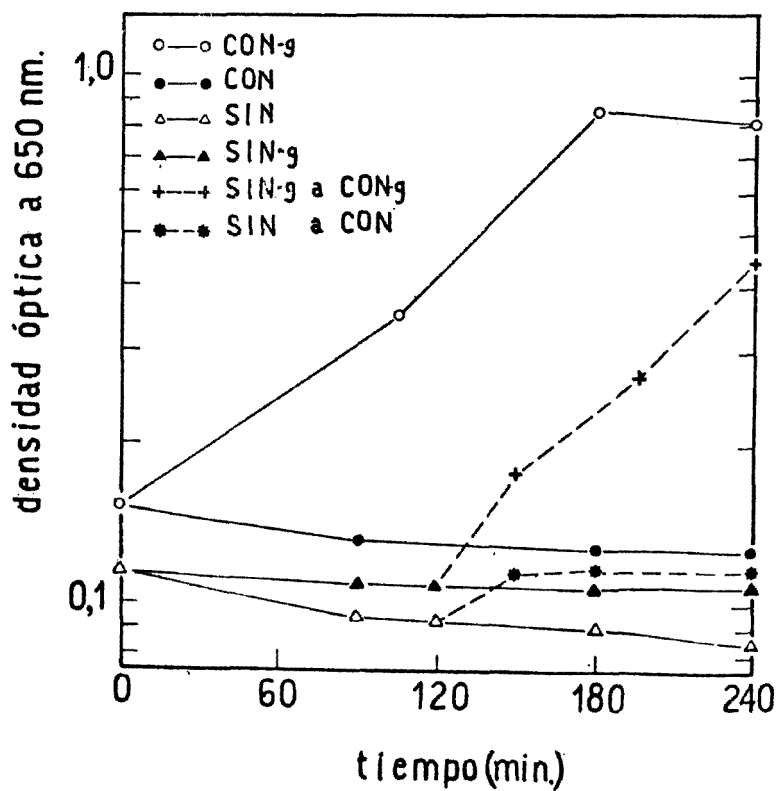


fig. (6) Efecto de la osmolalidad del medio sobre la masa bacteriana



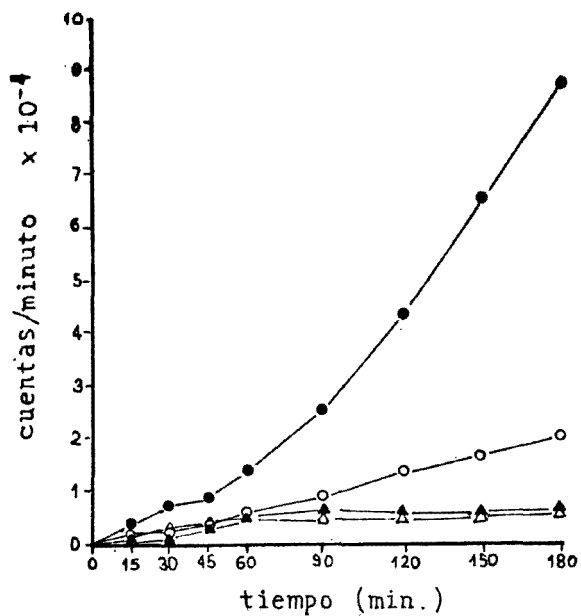


fig. (7a)

Incorporación
de Leucina H3

CON ○
CON-g ●
SIN △
SIN-g ▲

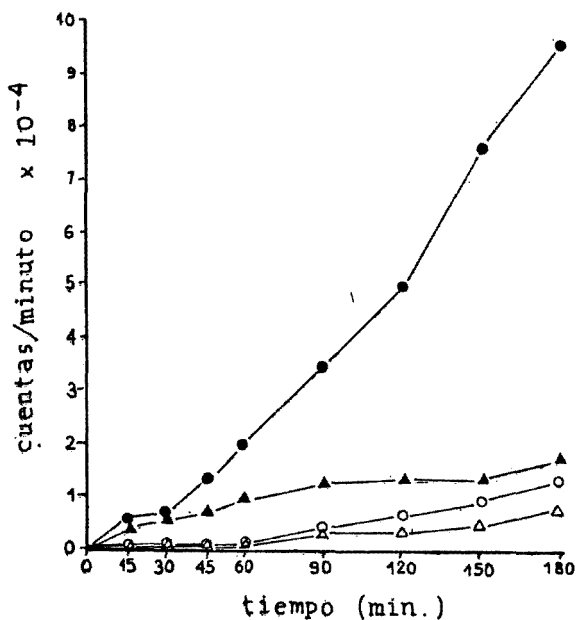


fig. (7b)

Incorporación
de Uracilo C14

CON ○
CON-g ●
SIN △
SIN-g ▲

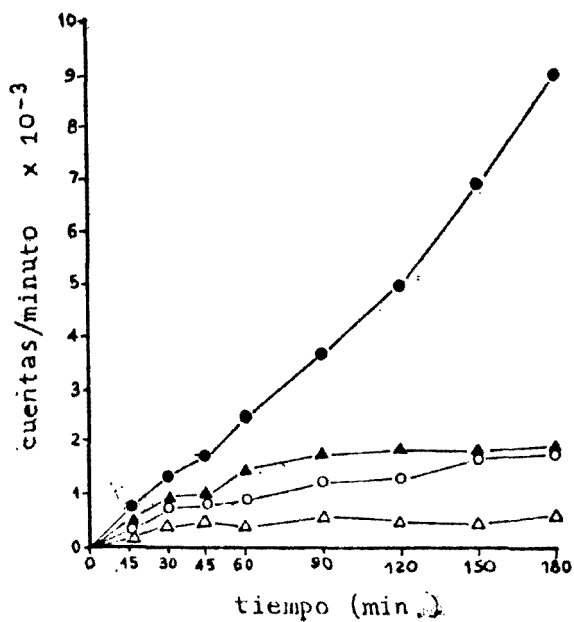


fig. (7c)

Incorporación
de Timidino H3

CON ○
CON-g ●
SIN △
SIN-g ▲

III). Efecto de la osmolalidad del medio sobre la actividad respiratoria de la cepa DA82.

Se efectuaron experimentos en los que se determinó el consumo de oxígeno, mediante un aparato de Warburg, de bacterias suspendidas en medios CON-g y SIN-g. Simultáneamente se probó el efecto del 2-fenil etanol sobre la actividad respiratoria. Esta droga, que afecta la permeabilidad de las envolturas bacterianas (145), genera efectos similares a los producidos en DA82 por tratamiento hipoosmótico (146). Se efectuaron controles utilizando las cepas LT2 y DA78 (1).

Resultados.

La incubación de la cepa DA82 en medio SIN-g, disminuyó al 25 % el consumo de oxígeno durante los primeros 15 minutos de incubación con respecto a lo observado en medio CON (fig 8a). El agregado de 2-fenil etanol (en adelante F.A.) a las bacterias incubadas en CON-g, dio lugar también a una depresión de la actividad respiratoria, que disminuyó a un 40 % durante los primeros 15 minutos. El F.A. no modificó la respuesta de las bacterias en SIN-g (fig 8a).

La actividad respiratoria de la cepa DA78 se mostró sólo muy ligeramente afectada cuando se la incubó en SIN-g, pero el agregado de F.A. redujo el consumo de oxígeno a un 45 % del obtenido en ausencia de esa droga durante los primeros 15 minutos (fig 8b).

En la cepa LT2, la incubación en medio SIN-g dio lugar a un ligero aumento del consumo de oxígeno, por otra parte el agregado de F.A. disminuyó al 60 % el consumo de oxígeno durante los primeros 15 minutos (fig 8c).

Se podría objetar a estos resultados en el hecho de que se está comparando distintas poblaciones, ya que las bacterias en CON-g crecen normalmente, y por el contrario en SIN-g la división se detiene. Sin embargo, si consideramos que DA82 tiene en CON-g un tiempo de

duplicación de aproximadamente 70 minutos, y tomamos en cuenta el consumo de oxígeno durante los primeros 15 minutos, vemos que el número de bacterias en CON-g luego de ese intervalo es solo 15 % mayor que en SIN-g, mientras que el consumo de oxígeno en CON-g fue un 150 % mayor que en SIN-g. Por lo tanto, resulta obvio que la diferencia de población no es suficiente para justificar la distinta actividad respiratoria..

Conclusiones:

La incubación en medio SIN-g tiene efectos inhibitorios importantes sobre la actividad respiratoria de la cepa DA82, pero no afecta mayormente a las cepas DA78 y LT2. El 2-fenil etanol deprime la respiración en las tres cepas, pero actúa con mayor intensidad en DA82, en este último caso la inhibición observada no resulta aditiva con la producida por incubación en SIN-g.

Figura 8

Para la determinación de la actividad respiratoria se utilizó un aparato de Warburg. Se emplearon frascos de 15 ml con un compartimiento principal, un receptáculo central, y un brazo lateral.

En el compartimiento principal se colocó 2,5 ml de una suspensión de bacterias en fase logarítmica (O.D. 650 \approx 0,4) preparada en M9-20 % con 0,01 % de glucosa. Para las muestras denominadas CON-g se colocó en el brazo lateral cantidad suficiente de solución de NaCl 4 m para llevar la concentración a 0,1 m, en las muestras SIN-g se sustituyó la solución de NaCl por un volumen equivalente de M9 20 %. Cuando se utilizó 2-fenil etanol, también se lo agregó en el brazo lateral. En el receptáculo central se colocó un trozo de papel de filtro embebido en solución de KOH 5 N.

Las lecturas se efectuaron a volumen constante, durante una hora a intervalos de 15 minutos. Se las corrigió por cambios en el termobarómetro, y los resultados se expresaron como μ l de oxígeno consumidos (147).

Efecto de la osmolalidad del medio, y del F.A. sobre la actividad respiratoria

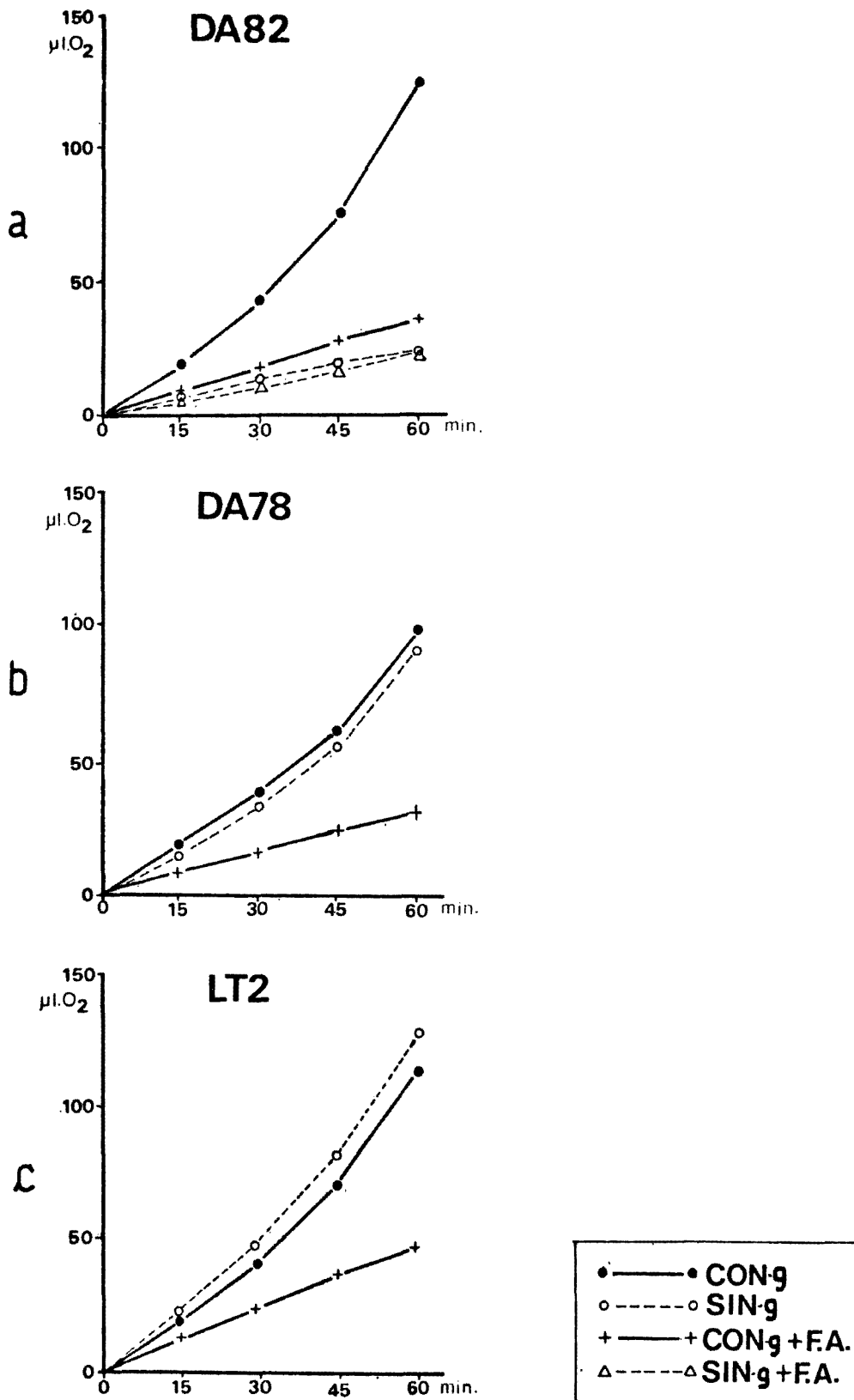


fig. 8

IV). Efecto de la osmolalidad del medio sobre el transporte de leucina

Las bacterias poseen un número de sistemas de transporte que operan a nivel de las envolturas, y los utilizan para captar del medio diversas sustancias, aún en contra de elevadas diferencias de concentración.

Se exploró la posibilidad de que los fenómenos que se hacen aparentes en DA82 cuando se la incuba en medios de baja osmolalidad se reflejaran en el mecanismo de transporte de leucina. Para ello se determinó la capacidad de DA82 para transportar dicho aminoácido en medios CON-g y SIN-g utilizando como control a la cepa LT2.

Resultados

En las bacterias incubadas en SIN-g, el transporte de leucina se redujo a un poco menos de la mitad de lo observado en CON-g (fig 9). Las dos cepas se comportaron en forma similar, ya que lo transportado durante 30 segundos de incubación en SIN-g por LT2 y DA82 alcanzó el 44 % y 38 % respectivamente de lo captado durante igual tiempo en CON-g por cada una de estas cepas.

Conclusiones

La incubación en medio de baja osmolalidad produce una disminución en la capacidad de transportar leucina, este fenómeno se cumple tanto en DA82 como en LT2, y en ambos casos llega a niveles similares. La reducción observada es posiblemente debida a la pérdida de la proteína de asociación que sería causada por la incubación en SIN-g. Es sabido que el sistema de transporte de leucina es sensible a tratamientos osmóticos (148,149), que son capaces de liberar al medio la proteína de asociación correspondiente (150,151,152).

Los resultados obtenidos sugieren que en DA82 el transporte de leucina no es afectado en forma particular por la baja osmolalidad.

Figura 2

Las determinaciones se efectuaron empleando la técnica descripta por Piperno y Oxender (1953). Células en fase logarítmica ($OD_{650} \approx 0,7-0,8$) fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento se enjuagó con M9 20 % conteniendo 0,01 % de glucosa 100 $\mu\text{g/ml}$ de Cloranfenicol, la OD_{650} se ajustó a 0,4, y la suspensión se dividió en 2 alícuotas, a una de ellas no se le efectuó ningún agregado (SIN-g), a la otra se le agregó NaCl hasta una concentración de 0,1 M (CON-g).

Ambas alícuotas se incubaron a 37° C con agitación durante 15 minutos; luego se agregó 3H-Leucina con una actividad de 0,68 mCi/ μM a una concentración final de 15 μM . A los 15 y 30 segundos después de agregada la leucina radioactiva, se tomaron muestras de 1 ml que se filtraron a través de membranas Millipore HA de 25 mm de diámetro y 0,45 μ de poro, que luego se lavaron con 5 ml de medio M9 precalentado a 25°C, y se secaron. La radioactividad retenida en los filtros se contó en un espectrómetro de centelleo líquido.

Los resultados se expresaron en forma porcentual tomando como 100 % el número de cuentas en las muestras sacadas a los 30 segundos de las bacterias incubadas en CON-g. Previamente se descontó la actividad incorporada por ensayos en blanco realizados con células toluenizadas.

Efecto de la osmolalidad del medio sobre el transporte de leucina

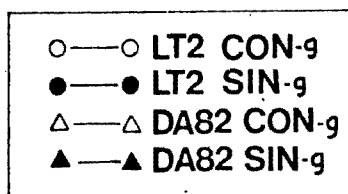
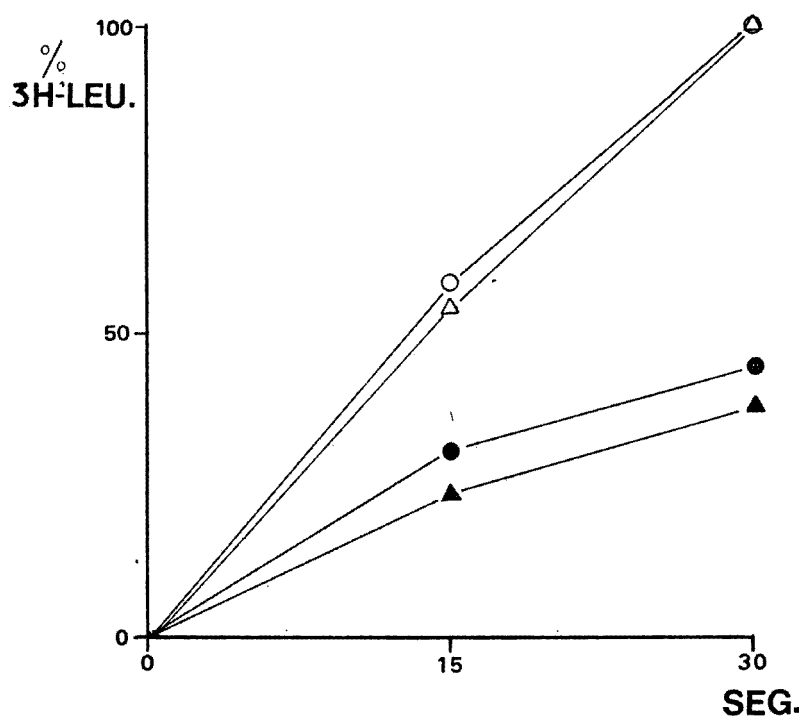


fig. 9

V). Efecto de la osmolaridad del medio sobre la actividad de succinodeshidrogenasa.

Con el propósito de estudiar funciones ligadas a las envolturas bacterianas y su posible relación con la osmosensibilidad de DA82 se determinó la actividad de succinodeshidrogenasa, enzima que puede considerarse un marcador de la membrana interna (43, 154). La actividad se midió siguiendo con un espectrofotómetro la decoloración del 2-6-diclorofenol usado como aceptor final, y empleando como intermediario metilsulfato de fenazina (155, 156).

Resultados.

Las actividades determinadas figuran en la tabla 1, se puede observar que en células enteras de DA82, la relación de las actividades en CON y SIN fue 1,49. Determinando la actividad en lisados obtenidos por ultrasonido, se observó una relación similar con un valor de 1,42.

En las cepas DA78 y LT2 no se encontraron diferencias significativas en las actividades determinadas sobre células enteras suspendidas en SIN o en CON. Mientras que, cuando se trabajó con lisados de esas cepas se advirtió un incremento de la actividad en SIN con respecto a CON de 1,39 veces para DA78 y 1,6 veces para la cepa LT2.

Conclusiones.

Como se desprende de los resultados obtenidos con los lisados, la actividad de succinodeshidrogenasa en las tres cepas analizadas, es dependiente del medio, resultando alrededor de una vez y media mayor en SIN que en CON.

Los datos disponibles no permiten precisar si el cambio en actividad es producido por la distinta osmolaridad de los medios

utilizados o se debe a un efecto particular del NaCl. Sin embargo estos resultados adquieren especial interés cuando se los compara con los obtenidos al efectuar determinaciones sobre células enteras.

Llama la atención el hecho de que mientras en las cepas utilizadas como control la actividad de succino deshidrogenasa no resulta afectada por el medio, en células intactas de DA82, la actividad cambia en la misma forma que en los lisados.

Esto sugiere que a nivel de las envolturas de DA82, existirían alteraciones que permitirían la producción de un aumento inusual de la permeabilidad en SIN, y darían lugar a que la enzima quedase expuesta a las variaciones del medio de la misma forma que ocurre en los lisados.

TABLA 1

CEPA	Actividad de succinodeshidrogenasa [ADO _{600nm} /minuto/militro]			
	Células enteras		Lisado	
	Medio CON	Medio SIN	Medio CON	Medio SIN
LT2	0,070	0,067	0,134	0,215
DA78	0,043	0,043	0,090	0,125
DA82	0,067	0,100	0,066	0,094

TABLA 1 . Efecto de la osmolalidad del medio sobre la actividad de succinodeshidrogenasa

Las actividades se determinaron sobre suspensiones de bacterias enteras, o sobre lisados obtenidos tratando esas suspensiones con ultrasonido (100 Watt durante 90 segundos) en un aparato Biosonik 300.

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 3 ml de medio SIN, los siguientes componentes en las concentraciones que se indican: succinato de sodio 0,017 M; cianuro de potasio 5 µM; metil sulfato de fenazina 1 µg/ml; bacterias en fase logarítmica 10⁷ por ml o lisado por ultrasonido en concentración equivalente. Cuando se deseaba trabajar en medio CON se agregaba NaCl a una concentración final de 0,1 m. La mezcla se preincubaba durante 7 minutos a 30°C y la reacción se comenzaba agregando 0,01 ml de una solución de 2-6 diclorofenol indofenol (1 µg/ml) siguiéndose los cambios de la D.O. a 600 nm en un espectrofotómetro.

VI). Efecto de la osmolaridad del medio sobre la captación de acriflavina.

La acriflavina es una sustancia normalmente excluida por las envolturas bacterianas, sin embargo, el tratamiento con agentes capaces de alterar la barrera de permeabilidad puede anular dicha capacidad de exclusión (145).

Para comprobar si la incubación de DA82 en medio SI causaba algún efecto a nivel de las envolturas que se manifestara a través de cambios en la captación de acriflavina, se efectuaron experimentos en los que se determinó la cantidad de dicha droga que quedaba en una solución de concentración conocida, luego de estar en contacto con bacterias bajo diferentes condiciones de osmolaridad.

Resultados:

Se puede observar (fig. 10) que en DA82 incubada en CON, hay un nivel de captación de acriflavina que es 3 veces superior al de la cepa DA78, y 10 veces mayor que para LT2, incubadas en las mismas condiciones.

La captación se eleva por incubación en medio SIN, en el caso de DA82 va en aumento durante los 120 minutos que se extendió el experimento, llegando en ese término a captar 4 veces más que en medio CON.

En DA78 también se eleva la captación por incubación en SIN, sin embargo, se detiene luego de 10 minutos, y en este caso los niveles sólo llegan al doble de lo captado en CON, y resultan unas 6,5 veces inferiores a los alcanzados por DA82 en SIN.

En cuanto a la cepa LT2, los niveles de captación de acriflavina fueron muy bajos resultando insignificantes con respecto a lo observado en DA82, de todas maneras hay una estimulación de la captación por un factor de aproximadamente 2 cuando se incuba en SIN con respecto a lo captado en CON.

Conclusiones:

En medio SIN, DA82 muestra un nivel de captación de acriflavina muy superior al observado en medio CON. Este comportamiento es similar al exhibido por bacterias normales cuando se las trata con agentes como el fenetil alcohol y el tolueno, que causan la ruptura de la barrera de permeabilidad (145).

La incubación en medio SIN de las cepas utilizadas como control, provoca también un aumento de la captación de acriflavina, pero mucho menos importante.

Aparentemente, la entrada de este colorante se hace en forma pasiva y constituye una medida de la permeabilidad de la célula (145), de tal manera que el aumento de la captación de acriflavina mostrado por DA82 en medio SIN puede estar reflejando un aumento en la permeabilidad, causado por la baja osmolalidad del medio.

Con las evidencias disponibles, no se puede afirmar fehacientemente que el comportamiento de DA82 frente a la acriflavina esté reflejando realmente cambios en la permeabilidad y no un aumento de la afinidad por esa substancia en la superficie celular. De todas maneras los resultados obtenidos llaman la atención porque parecen indicar la producción de algún tipo de alteración en la envoltura de DA82 como consecuencia del descenso de la osmolalidad del medio.

Otro aspecto interesante es el hecho de que mientras en las cepas control el equilibrio se alcanza rápidamente, en DA82 la captación continúa en medio SIN durante por lo menos 2 horas. Esto puede significar que mientras el cambio originado en LT2 y DA78 por el choque hiposmótico es pasajero, en DA82 se producen modificaciones por efecto de la baja osmolalidad, que no alcanzan a ser compensadas.

Por otra parte, el hecho de que DA82 tenga un elevado nivel basal de captación de acriflavina, puede indicar la existencia de un defecto a nivel de las envolturas, que en este caso se hace evidente aún en un medio de osmolalidad normal.

Figura 10.

Bacterias de las copas DA22, DA78 y IT2, en fase logarítmica ($D.O._{650} = 0,7-0,8$), fueron recolectadas por centrifugación.

El sedimento fue enjuagado con M9 20 %, resuspendido en el mismo medio a una concentración de 10^9 bacterias por ml.

A tiempo cero, dos alícuotas de esas suspensiones fueron diluidas 100 veces en medios CON y SIN, precalentados a $37^{\circ}C$, que contenían $4 \mu g/ml$ de acriflavina. A los tiempos indicados se tomaron muestras de 2 ml de las que se separaron las bacterias por centrifugación durante 1 minuto a $25.000 g$, determinándose luego la $D.O._{450}$ del sobrenadante. Los datos graficados en la figura correspondiente a lo captado por poblaciones de 10^7 bacterias/ml.

La metodología empleada no permite apreciar con exactitud el momento en que se separan las células del medio. Se estima que esa separación se completa entre 30 y 60 segundos después del tiempo indicado en el gráfico. Este error de apreciación es importante a tiempo cero, donde la captación de acriflavina es muy rápida, pero no es significativo en el resto de los puntos.

Captación de Acriflavina

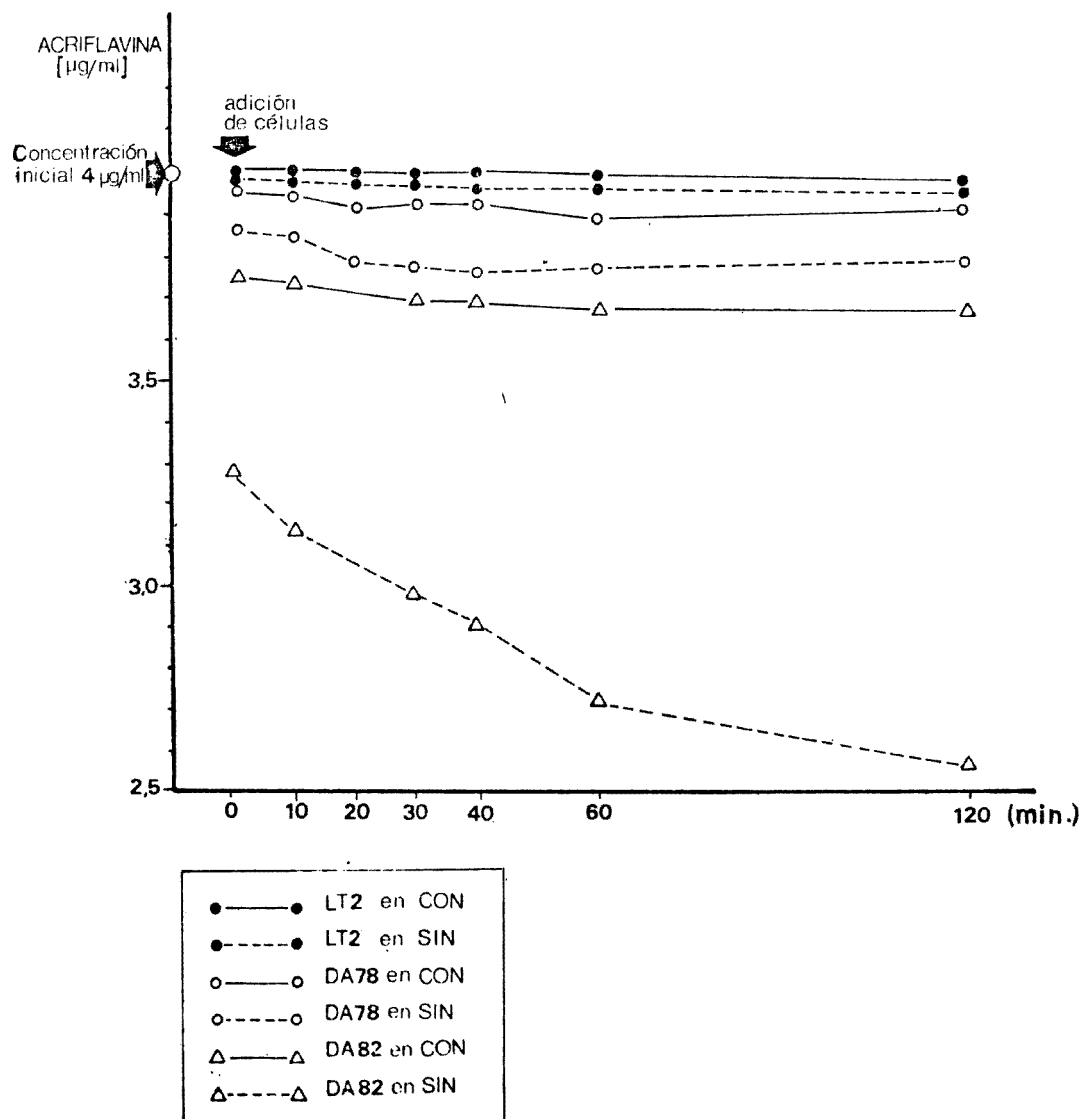


fig. 10

VII). Proteínas de la envoltura. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Recientemente se han desarrollado métodos para separar la membrana interna de la externa, permitiendo el análisis independiente de las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (157).

Esta metodología se utilizó para explorar la posibilidad de que las alteraciones que presenta DA82 a consecuencia de la mutación en el gen BAC dieran lugar a la aparición de cambios en las proteínas que componen su envoltura.

Las dos capas fueron separadas siguiendo una de las técnicas descritas por Osborn (157), seguidamente se las analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida según lo aconsejado por Ames (7).

Dado que en el momento en que se realizaron los estudios D.N. Antón había logrado transferir la mutación bac-, responsable de las propiedades de DA82, y debido a que resultaba conveniente comparar los efectos de dicha mutación en dos cepas que difieren sólo en ese carácter, se utilizaron para los experimentos el par de cepas compuesto por DA183 (bac-) y DA230 (bac+).

Los resultados obtenidos son extrapolables a DA82 ya que DA183 posee el fenotipo característico de DA82.

Resultados:

La figura 11 muestra que al someter un preparado de membranas a una separación por electroforesis en gradientes de sacarosa (157) se resolvieron dos picos principales, y un tercero de escasa magnitud. Por analogía con lo descrito por Osborn, el pico que mostró mayor migración hacia el ánodo, correspondería a

membrana interna, el de menor movilidad a membrana externa, y el pico pequeño de movilidad intermedia, representaría material sin separar.

Al analizar muestras correspondientes a los dos tipos principales mediante electroforesis en placa de poliacrilamida, se observó que, mientras los geles de la membrana interna de las dos cepas examinadas respondían a un patrón similar, los correspondientes a los preparados de la membrana externa de DA126 (bac -), exhibían una banda menos que los de la cepa DA230 (bac +) utilizada como control (figura 12).

Conclusiones:

Los resultados obtenidos señalan la posibilidad de que la mutación bac - se exprese a través de la disminución o desaparición de una de las proteínas de la membrana externa.

Con los datos disponibles no es posible adjudicar a esa desaparición la responsabilidad de la determinación de las propiedades de los mutantes bac -, sin embargo, el hecho de que por lo menos una de las proteínas de membrana pueda ser afectada, resulta un tema que merece un estudio más profundo.

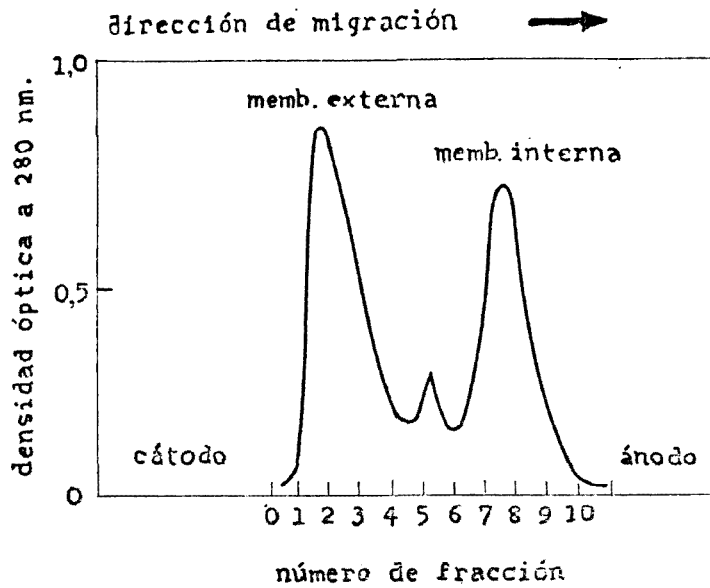


fig.11

Separación de membranas externa e interna por electroforesis en gradiente de sacarosa

Se efectuaron preparaciones de membranas de las cepas DA230 y DA183 siguiendo la técnica de Osborn (4). Muestras de esas preparaciones fueron sembradas en gradientes lineales (10% a 30%) de sacarosa y sometidas a electroforesis según lo indicado por Osborn (157). Una vez completada la separación, los gradientes fueron fraccionados utilizando una jeringa ISCO con sacarosa al 60%.

La figura muestra el registro de densidad óptica obtenido durante el fraccionamiento mediante un analizador ISCO.

Las fracciones correspondientes a cada uno de los picos principales fueron combinadas y utilizadas posteriormente para análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida.

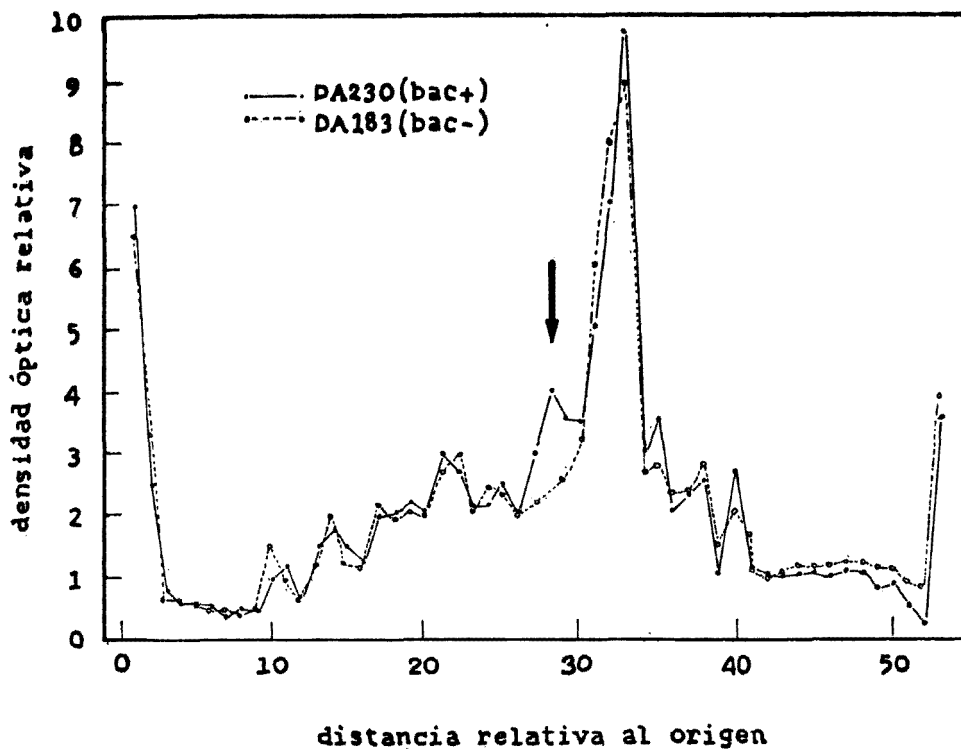


fig. 12

Trazado densitométrico de electroforesis de membrana externa de las cepas DA230 y DA183

Las corridas electroforéticas se realizaron en placas de poli-acrilamida, conteniendo laurilsulfato de sodio, según la técnica descrita por Ames (7) . La flecha indica la posición de la banda ausente en los preparados de la cepa DA183.

VIII). Efecto de la osmolalidad del medio sobre la sensibilidad a la radiación ultravioleta.

Al estudiar la influencia de la osmolalidad del medio en la respuesta de la cepa DA82 frente a la radiación ultravioleta (2537 Å) se encontró que en el momento de la irradiación esa variable no influye sobre la sensibilidad, pues el comportamiento no se alteraba cuando se irradiaban células en medio SIN-g o CON-g (159).

Sin embargo, aparecían diferencias de comportamiento cuando previamente a la irradiación las bacterias eran incubadas en esos mismos medios. Se realizaron experimentos con el fin de analizar la influencia de las condiciones de incubación previas a la irradiación sobre la resistencia a ultravioleta.

Resultados:

Las células mostraron un considerable aumento de su resistencia a la radiación ultravioleta tras 60 minutos de incubación en medio SIN-g, en tanto que las bacterias mantenidas por igual lapso en medio CON-g no alteraron su respuesta a la radiación (fig 13).

La resistencia del cultivo en SIN-g se mantuvo en incubaciones de hasta 6 horas (fig 14). En cambio, la sensibilidad del cultivo en CON-g experimentó una disminución en el momento en que éste entró en fase estacionaria y alcanzó los niveles mostrados desde varias horas antes por el cultivo en SIN-g (Fig 14).

El agregado de ácido nalidixico, que actúa como inhibidor de la replicación del ADN (160), impidió la adquisición de la resistencia por las bacterias en SIN-g, pero no afectó la respuesta de aquellas en CON-g, ni fue capaz de modificar el comportamiento del cultivo en SIN-g una vez que la elevación en los niveles de resistencia se habían manifestado (Fig 15).

El agregado de cloranfenicol, que inhibe la síntesis de proteínas e impide la iniciación de nuevos ciclos de replicación del ADN (161), a cultivos en SIN-g, no modificó en nada la respuesta de éstos, mientras que cuando se agregó este inhibidor a cultivos en CON-g se produjo, luego de 60 minutos, un aumento de la resistencia a ultravioleta hasta el nivel propio de las bacterias en SIN-g (Fig 16). Este efecto del cloranfenicol fue anulado por la presencia simultánea de ácido nalidíxico. (Fig 16).

Debe tenerse en cuenta que, si bien se comparan poblaciones diferentes, los resultados se expresan como fracción de bacterias sobrevivientes, es decir, que se está comparando el número de bacterias que mantiene su viabilidad en una muestra, luego de determinada dosis de radiación, con el número de bacterias viables en esa misma muestra antes de ser irradiada; este tratamiento independiza la expresión de los resultados de la densidad de la población.

Conclusiones:

La resistencia desarrollada por DA82 durante la incubación en un medio de baja osmolalidad, tiene características similares a la que se manifiesta cuando bacterias incubadas en medio de osmolalidad normal llegan a la fase estacionaria, o son sometidas a tratamientos que impiden la iniciación de nuevos ciclos de replicación. El ácido nalidíxico, que inhibe la replicación del ADN, impide la adquisición de esa resistencia, pero es incapaz de revertirla cuando las bacterias ya se han vuelto resistentes. El cloranfenicol, que impide la iniciación de nuevos ciclos de replicación, muestra una inducción de resistencia que en el caso de las bacterias en SIN-g se superpone con el efecto del medio.

Es un hecho conocido que las bacterias con cromosomas en estado de reposo, son más resistentes al efecto de las radiaciones

que aquellas que se hallan en crecimiento (162). Se ha postulado que esa resistencia se debe a que la reparación del daño producido por radiaciones, es mas eficiente en células con cromosomas completos, o bien que el punto de replicación es especialmente sensible a las radiaciones (163).

Los resultados sugieren que en medio SIN-g, probablemente a consecuencia de la inhibición de la síntesis de macromoléculas que tiene lugar en esas condiciones (Ver Cap. II), DA82 deja de iniciar nuevos ciclos de replicación y al entrar su genoma en reposo, adquiere una mayor resistencia a radiación ultravioleta.

Figura 13.

Bacterias de la cepa DA82, en fase logarítmica (DO_{650} 0,6-0,8), fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento fue enjuagado y resuspendido con medio SIN-g a una $D.O_{650}$ de aproximadamente 0,1. La suspensión fue dividida en dos alícuotas que se incubaron a 37°C con agitación; a una de ellas se agregó 0,1 M NaCl (CON-g), y a la otra se la utilizó directamente (SIN-g).

A tiempo cero se separaron porciones de las suspensiones en CON-g y SIN-g que fueron irradiadas con luz ultravioleta (2537 Å) en dosis de 180, 360 y 540 erg/mm^2 ; se reservó una fracción sin irradiar para determinar el número de bacterias (N°), y se retiraron muestras luego de cada exposición, para determinar el número de bacterias sobrevivientes (N).

A los 60 minutos se irradió con las dosis antes indicadas el resto de las suspensiones en CON-g y SIN-g determinándose N° y N.

La estimación del número de bacterias viables se efectuó por recuento de colonias en placas de agar nutritivo.

Cepa DA82- Curvas de sensibilidad a radiación
ultravioleta en medios CON-g y SIN-g

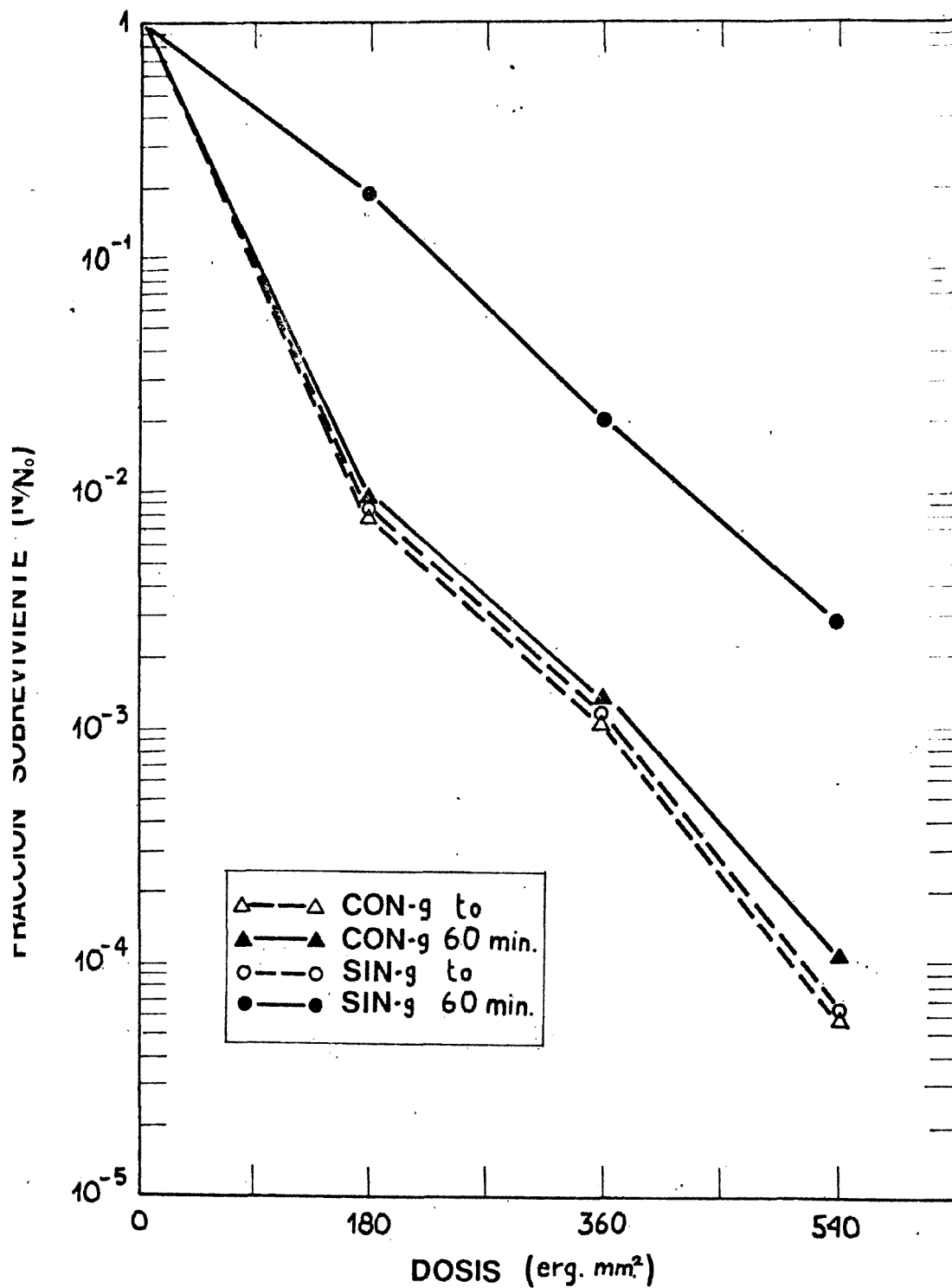


fig. 13

Figura 14.

Se incubaron a 37°C con agitación suspensiones de la cepa DA82 en medios CON-g y SIN-g, preparadas según se indicó en la leyenda correspondiente a la figura 13.

A los tiempos señalados se separaron muestras que se irradiaron con 540 erg/mm² de luz ultravioleta (2537 Å). La fracción de bacterias sobrevivientes se determinó efectuando recuento de colonias en placas de agar nutritivo.

Cepa DA82- Variación de la sensibilidad a radiación ultravioleta (540 erg/mm²) en medios CON-g y SIN-g

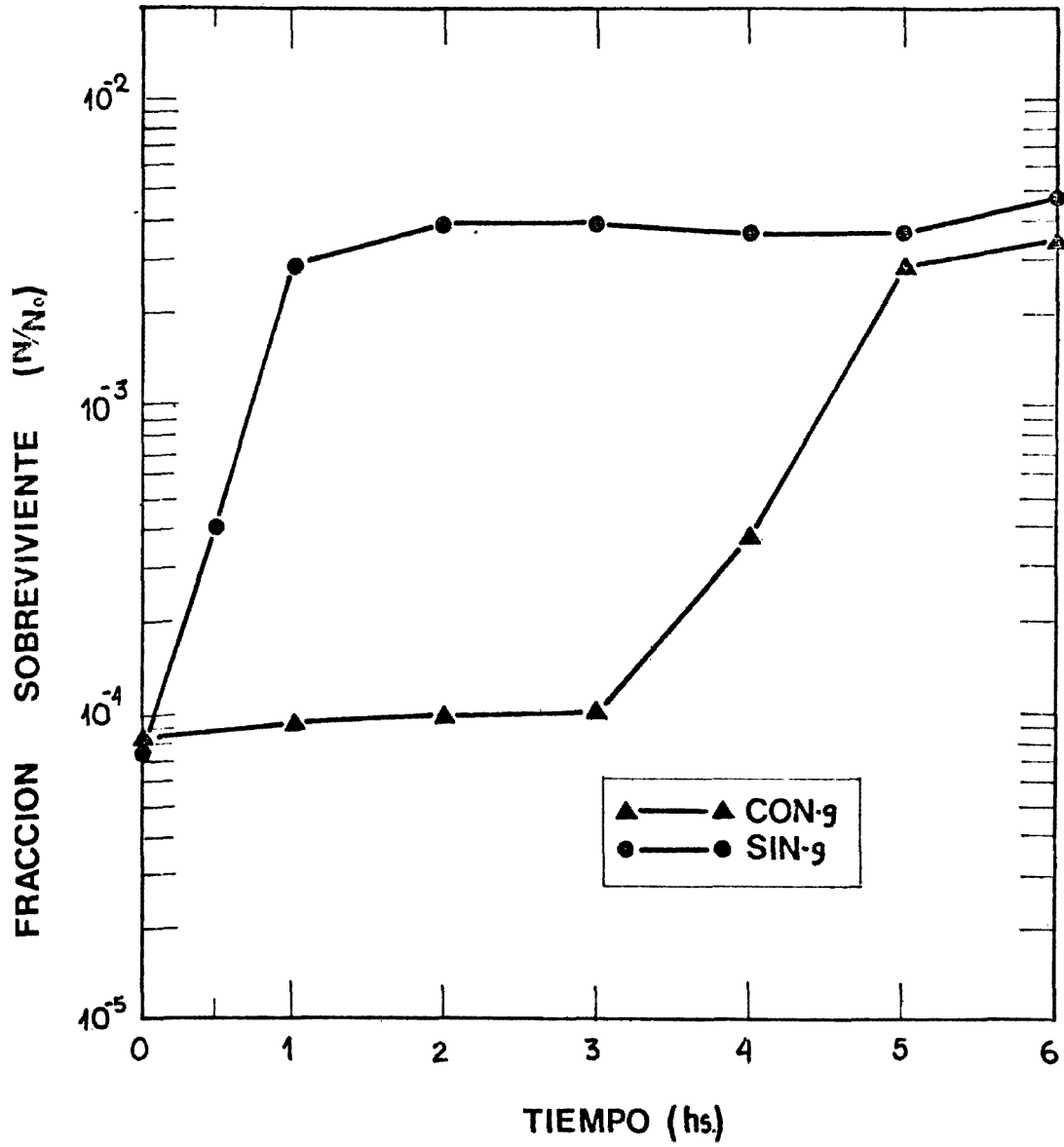


fig. 14

Figura 15.

Se prepararon suspensiones de bacterias de la cepa DA32 en medios CON-g y SIN-g, según se indicó en la leyenda de la figura 15.

Cada una de las suspensiones fue dividida en dos alícuotas. A una de ellas se le agregó 15 µg/ml de ácido nalidíxico (nal.), y a la otra no se le efectuó ningún agregado.

Se incubó a 37°C con agitación. Luego de 60 minutos se irradiaron fracciones de cada una de las alícuotas con las dosis que se indican en la figura.

Al resto de la alícuota incubada en medio SIN-g se le agregó 15 µg/ml de ácido nalidíxico, y se continuó la incubación por otros 60 minutos. Pasado este tiempo, se irradió con las dosis de ultravioleta que se indican en la figura. En todos los casos se determinó la fracción de bacterias sobrevivientes, efectuando recuento de colonias en placas de agar nutritivo.

Cepa DA82- Curvas de sensibilidad a ultravioleta en
CON-g y SIN-g; influencia del ácido nalidixico

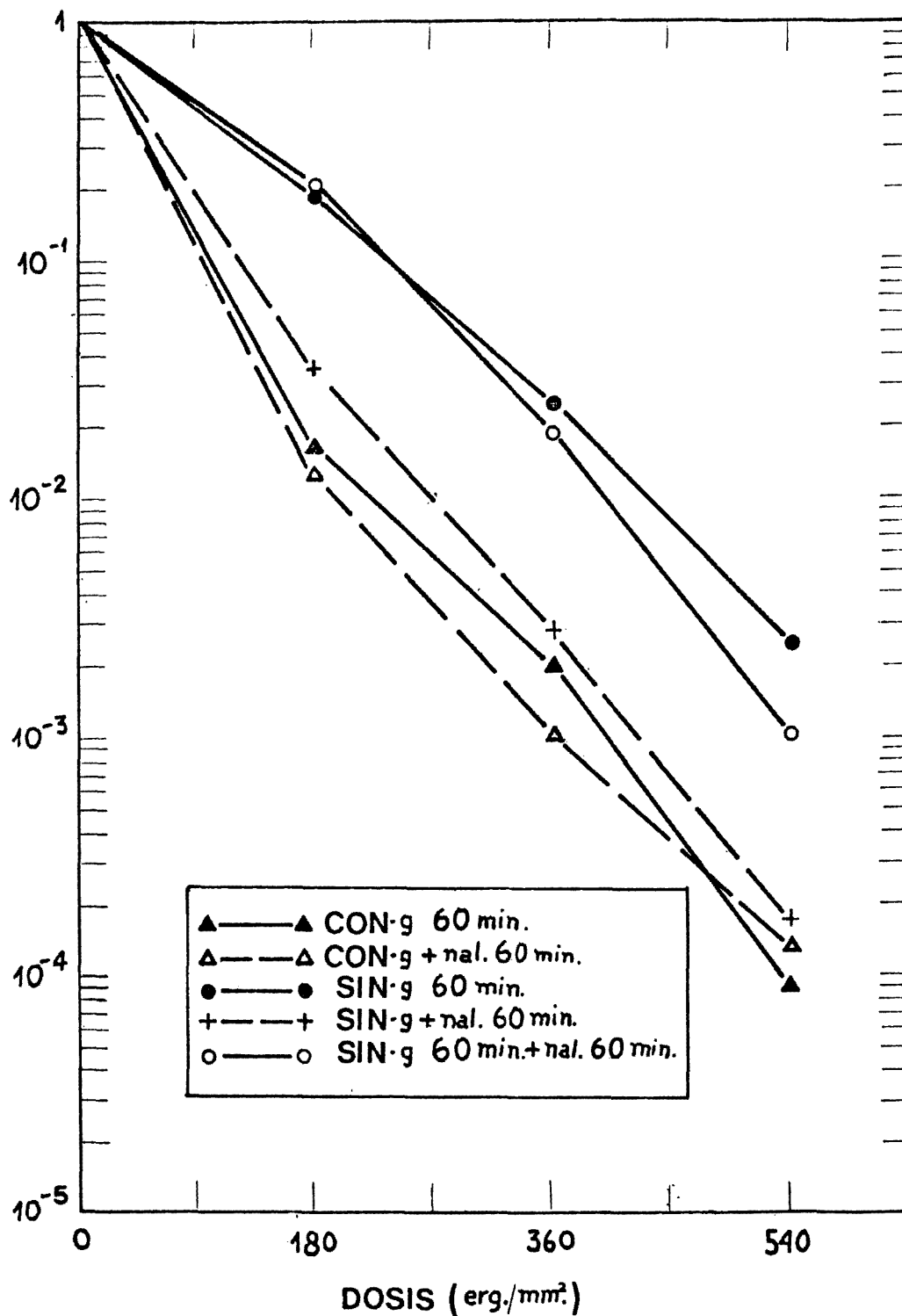


fig. 15

Figura 16.

Se prepararon suspensiones de bacterias de la cepa DA62 en medios CON-g, según se indicó en la leyenda de la figura 13.

La suspensión en SIN-g se dividió en dos alícuotas; una de ellas se incubó directamente, la otra, previo agregado de 150 µg/ml de Cloranfenicol (Caf.).

La suspensión en CON g se dividió en tres alícuotas; la primera se incubó directamente, la segunda, previo agregado de 150 µg/ml de Cloranfenicol, y la tercera con 150 µg/ml de Cloranfenicol y 15 µg/ml de ácido nalidíxico.

Las suspensiones se incubaron a 37°C con agitación durante 60 minutos. Pasado este período, se irradió con las dosis que se indican en la figura, y se determinó la fracción de bacterias sobrevivientes por recuento de colonias en placas de agar nutritivo.

Cepa DA82- Curva de sensibilidad a ultravioleta en
CON-g y SIN-g; influencia del cloranfenicol y ácido
nalidixico

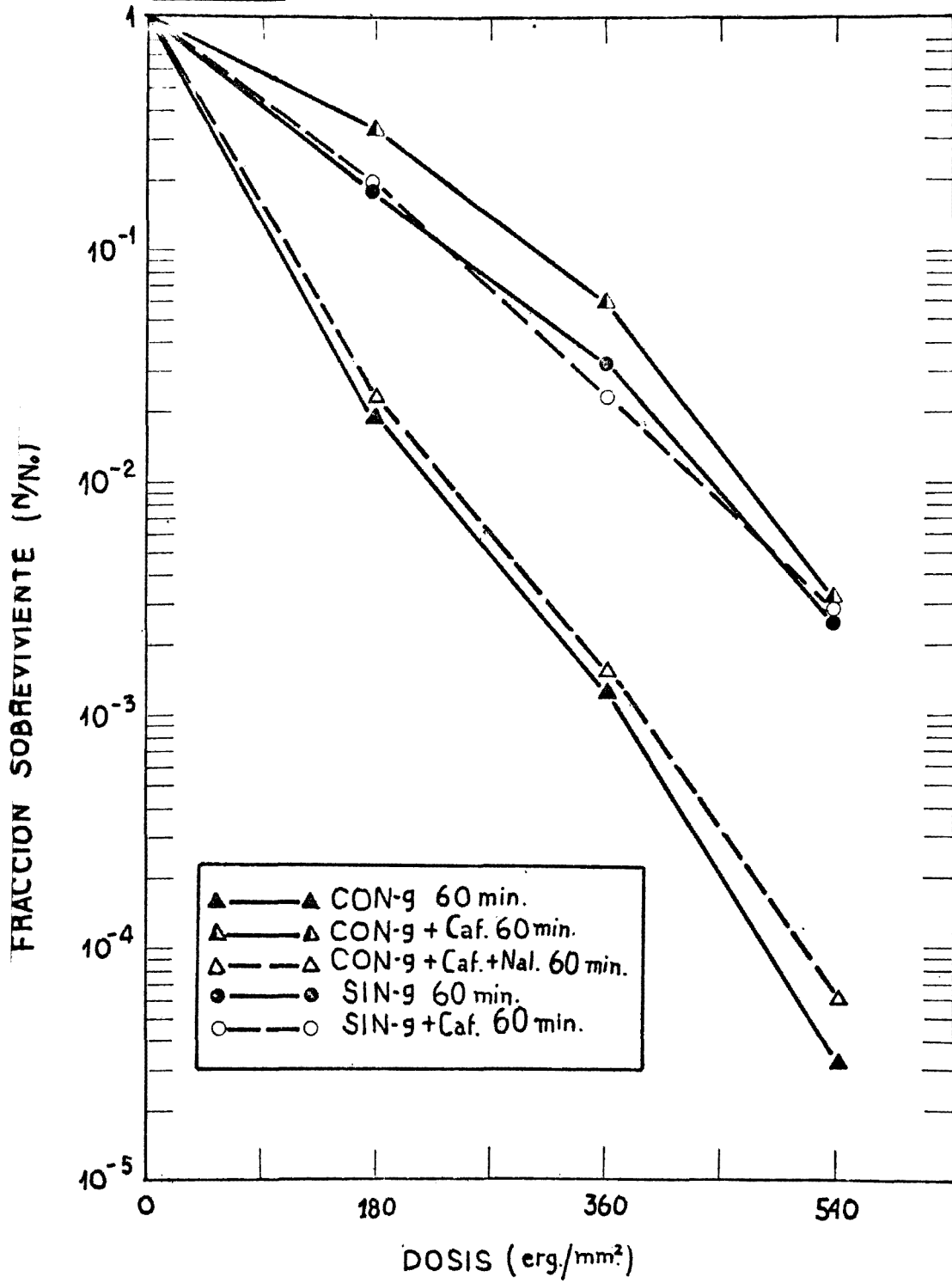


fig. 16

IX) Efecto de la composición del medio sobre la recuperación por incubación en medio líquido.

La incubación en un medio líquido no nutritivo durante un lapso más o menos prolongado, permite la recuperación parcial de suspensiones de bacterias irradiadas con luz ultravioleta. Esta recuperación se manifiesta como un aumento en el número de bacterias sobrevivientes con respecto al observado inmediatamente después de la irradiación. Este fenómeno, denominado recuperación por incubación en medio líquido (RIL) depende de la actividad del mecanismo enzimático de reparación por escisión (82).

Se estudiaron las condiciones de tratamiento post-irradiación que permiten una RIL óptima en el mutante D482, con el fin de determinar posteriormente si existía alguna relación entre la osmosensibilidad de esta cepa, y su capacidad para llevar a cabo la reparación por escisión.

Resultados:

1). Efecto de la composición del medio de irradiación sobre la RIL:

Como puede observarse en los resultados que aparecen en la tabla 2, la composición del medio de irradiación tiene gran importancia en la recuperación, pues cambios en el mismo producen grandes variaciones en la eficiencia de la RIL. La irradiación en la solución compleja M9-20 % (SIN) permite una recuperación muy superior a la que se observa con soluciones de una sola sal, aunque la osmolalidad sea similar en todos los casos. Entre las sales puras se observan también diferencias, siendo la más eficaz KCl, luego NH_4Cl , MgCl_2 y finalmente NaCl.

2). Efecto del lavado por centrifugación:

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 3; puede observarse que el lavado de las bacterias por centrifugación originó la disminución de la capacidad de recuperación, que llegó a anularse luego de dos ciclos de lavado.

Este tratamiento produjo también aumentos escalonados en la resistencia a radiación ultravioleta (tabla 3). Dichos aumentos son de poca magnitud frente a la variabilidad general de los resultados, sin embargo, deben ser tenidos en cuenta pues se repitieron en todos los experimentos realizados.

3). Efecto de la composición del medio de incubación:

Como puede verse en las tablas 3 y 4 y se detalla más adelante (Ver Capítulo X) la osmolalidad del medio de incubación modifica fuertemente la eficiencia de la recuperación. Cuando se mantiene la misma osmolalidad se aprecian importantes diferencias en la efectividad de alguna de las sales usadas. En tanto NaCl o KCl permiten recuperaciones semejantes o aún superiores a las obtenidas con el medio M9 no diluido, la eficiencia de NH_4Cl y MgCl_2 es mucho menor.

4). Efecto de la riqueza del medio de incubación:

De los resultados que se muestran en la tabla 5 puede concluirse que la riqueza del medio tiene un efecto negativo sobre la recuperación, el sólo agregado de 0,5 % de glucosa resultó suficiente para inhibir fuertemente la RIL. El agregado de hidrolizado de caseína produjo una disminución de la viabilidad, que fue mayor cuando se agregó glucosa e hidrolizado de caseína juntos.

Conclusiones:

Las condiciones para obtener una buena respuesta de RIL en la cepa DA82 son:

- a). Al efectuar el cambio de las bacterias desde el medio de crecimiento al de irradiación, no se deben efectuar lavados por centrifugación, puesto que con ese tratamiento se limita la capacidad de RIL. Para evitar el efecto negativo que podrían tener los restos de glucosa del medio de crecimiento, resulta suficiente enjuagar el sedimento, sin resuspenderlo, con el medio de irradiación.
- b). La capacidad de recuperación depende ampliamente de la composición del medio de irradiación, siendo SIN (M9 20 %) el más adecuado entre los medios probados.
- c). La composición del medio de incubación influye considerablemente en la recuperación. En este efecto no cuenta solamente la concentración de las sales utilizadas, sino también la naturaleza de las mismas. Se obtienen recuperaciones óptimas incubando en medio de osmolalidad normal (250 mOs) compuestos por mezclas complejas de sales (M9) o esas mismas mezclas diluidas (M9-20 %) y adicionadas de soluciones puras de sales.
- d). Cuanto más pobre es el medio, se producen mejores recuperaciones. La mayor eficiencia de RIL se obtiene en condiciones de carencia de fuente de energía.

Tabla 2.

Un cultivo de la cepa D402, en fase logarítmica (D.O.₆₅₀ 0,6-0,8), fue dividido en alícuotas, y las células se recolectaron por centrifugación. Cada uno de los sedimentos obtenidos fue enjuagado y resuspendido con una de las soluciones en la primera columna de la tabla 2, ajustando a 0,1 la D.O.₆₅₀.

Las suspensiones fueron irradiadas con una dosis de 540 erg/mm² de U.V. (2537 Å); inmediatamente después la opacidad de todas las muestras fue llevada a aproximadamente 25% de la original, mediante el agregado de cantidad suficiente de medio 19-10 veces concentrado.

Se incubó a 37°C con agitación durante 2 horas. La viabilidad se determinó a los tiempos que se indica, efectuando recuento de colonias en cajas de agar nutritivo.

La fracción sobreviviente corresponde al resultado de dividir el número de bacterias que continúa viable luego de determinada dosis de radiación, por el número de bacterias viables existentes en la muestra antes de ser irradiada.

La relación de recuperación resulta de dividir la fracción sobreviviente, luego de un determinado tiempo de incubación (en este caso 2 horas) por la fracción sobreviviente inmediatamente después de la irradiación (tiempo cero).

TABLA 2

MEDIO DE IRRADIACION	FRACCION SOBREVIVIENTE A TIEMPO CERO [F ₀]	FRACCIÓN SOBREVIVIENTE A LAS 2 HORAS [F ₂]	RELACION DE RECUPERACION [F ₂ /F ₀]
SIN [M9-20%]	$6,2 \times 10^{-5}$	1×10^{-1}	1612
0,025 m NaCl	$2,7 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-2}$	122
0,025 m KCl	2×10^{-4}	$7,2 \times 10^{-2}$	360
0,025 m NH ₄ Cl	$1,25 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-2}$	216
0,0187 m MgCl ₂	$8,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$	176

RIL Efecto de la composición del medio de irradiación

Tabla 3. RIL; efecto de los lavados

Un cultivo de la cepa DA82 en fase logarítmica ($DO_{650} - 0,6-0,8$) fue procesado como se indica en las leyendas de la columna 1, las suspensiones obtenidas fueron irradiadas con U.V. (540 erg/mm^2 a 2537 \AA). Luego de la irradiación se incubó en las condiciones que figuran en las columnas 2 y 3.

El significado de los términos "Fracción sobreviviente" y "Relación de recuperación" figura en la leyenda de la tabla 2.

TABLA 3

TRATAMIENTO PREVIO A LA IRRADIACION	MEDIO DE INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACION [h.]	FRACCION SOBREVIVIENTE A 540 erg./mm. ²	RELACION DE RECUPERACION
Las células fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento fue enjuagado y resuspendido con SIN	SIN	0	$1,5 \times 10^{-5}$	1
	SIN	2	9×10^{-4}	60
	CON	2	$4,5 \times 10^{-2}$	3000
Las células fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento fue resuspendido en SIN, centrifugado nuevamente, y vuelto a resuspender en SIN.	SIN	0	$2,6 \times 10^{-5}$	1
	SIN	2	8×10^{-5}	3
	CON	2	$3,2 \times 10^{-3}$	123
Las células fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento fue resuspendido en SIN, nuevamente centrifugado y resuspendido en SIN, vuelto a centrifugar y finalmente resuspendido en SIN	SIN	0	4×10^{-5}	1
	SIN	2	$4,2 \times 10^{-5}$	1,05
	CON	2	$1,5 \times 10^{-4}$	3,7

TABLA 4

COMPOSICION DEL MEDIO DE INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACION [h]	FRACCION SOBREVIVIENTE	RELACION DE RECUPERACION
SIN	0	6×10^{-5}	1
SIN	2	$2,6 \times 10^{-4}$	4,3
M9	2	$2,4 \times 10^{-2}$	400
SIN +0,1m NaCl[CON]	2	$3,3 \times 10^{-2}$	550
SIN +0,1m KCl	2	3×10^{-2}	500
SIN +0,1m NH ₄ Cl	2	$3,5 \times 10^{-3}$	58
SIN +0,067m MgCl ₂	2	$1,1 \times 10^{-3}$	18

RIL; Efecto de la composición del medio de incubación

Bacterias de la cepa DA82 en fase logarítmica (D.O.₆₅₀ 0,6-0,8) fueron recolectadas por centrifugación. El sedimento fue enjuagado con SIN y resuspendido en esa solución ajustando a 0,1 la D.O.₆₅₀.

Se irradió la suspensión con U.V. (540 erg/mm²-2537 Å) y se dividió en alícuotas que recibieron los agregados detallados en la primer columna.

Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C con agitación. A los tiempos indicados la viabilidad se determinó por recuento de colonias en placas de agar nutritivo

El significado de los términos "Fracción sobreviviente" y "Relación de recuperación" figura en la leyenda de la tabla 2.

TABLA 5

MEDIO DE INCUBACION	FRACCION SOBREVIVIENTE [a tiempo cero]	FRACCION SOBREVIVIENTE [a las dos horas]	RELACION DE RECUPERACION
M9	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-2}$	687
M9+glucosa	$3,2 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-4}$	9
M9+hidrolizado de caseina	$3,2 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	0,44
M9+hidrolizado de caseina+glucosa	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-6}$	0,09

RIL: Efecto de la riqueza del medio de incubación

Bacterias de la cepa DA82 en fase logarítmica (D.O.₆₅₀ 0,6-0,8) fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento fue enjuagado con M9 y resuspendido en el mismo medio, ajustando la D.O.₆₅₀ a 0,1. La suspensión fue irradiada con U.V. (540 erg/mm² a 2537 Å) y dividida en cuatro alícuotas que se incubaron a 37°C durante 2 horas, con agitación, agregando previamente a una de ellas 0,5% de glucosa, a otra 0,5% de hidrolizado de caseína, a la tercera 0,5% de glucosa y 0,5% de hidrolizado de caseína, la cuarta alícuota fue incubada sin agregados.

La viabilidad se determinó a los tiempos que se indican por recuento de colonias en cajas de agar nutritivo.

El significado de los términos "Fracción sobreviviente" y "Relación de recuperación" figura en la leyenda de la tabla 2.

X). Efecto de la osmolalidad del medio sobre la RIL.

De los resultados expuestos en las tablas 3 y 4, se hace evidente que la recuperación de DA82 por incubación en medio líquido, es altamente dependiente de la osmolalidad del medio; esto resulta interesante puesto que la RIL es una expresión del mecanismo de reparación por escisión (82).

Para estudiar en forma más detallada este fenómeno, se efectuaron experimentos en los que se siguió la cinética de recuperación en condiciones de osmolalidad normal (250 mOs.), y en medio de baja osmolalidad (50 mOs.).

Como medio de osmolalidad normal se utilizó CON, que según se desprende de los resultados obtenidos (tabla 4) es uno de los más adecuados para promover la recuperación; como medio de baja osmolalidad se empleó SIN. La cepa DA78 fue utilizada como control.

Resultados:

Recuperación por incubación en medio líquido de la cepa DA82:

Como puede verse en la figura 17, la fracción sobreviviente luego de irradiar bacterias de esta cepa con una dosis de 540 erg/mm^2 , fue de $7,4 \times 10^5$. La incubación en CON dio lugar a un aumento de la viabilidad, que siguió una cinética exponencial. Dicho aumento fue más rápido durante las primeras dos horas, ya que durante este período la viabilidad subió a razón de 25 veces por hora, mientras que en la tercer hora aumentó sólo 1,4 veces.

Por otra parte, las bacterias en SIN también se recuperaron, aunque en forma sensiblemente más lenta. En el transcurso de la primera hora en SIN, la viabilidad aumentó 2,5 veces; en la segunda hora 3,9 veces y 6,6 durante la tercera. Como consecuencia de

esto, luego de dos horas de incubación en SIN, el aumento en la viabilidad fue de aproximadamente 10 veces, mientras que para las mantenidas en CON por igual lapso, la viabilidad subió 627 veces.

Reversibilidad de la inhibición de la recuperación manifestada en SIN:

Al pasar a CON las bacterias incubadas en SIN, mediante el agregado de 0,1 m NaCl, la velocidad de recuperación manifestada en medio de baja osmolalidad cambió; continuando a partir de ese momento con características similares a las manifestadas por las bacterias mantenidas en CON desde inmediatamente después de la irradiación (figura 18).

Efecto de la osmolalidad del medio sobre la RIL de DA78:

La RIL de bacterias de la cepa DA78 fue poco influenciada por la osmolalidad del medio. Mientras que la incubación durante las 2 horas posteriores a la irradiación causó un aumento de unas 135 veces en la viabilidad (figura 19), el mantenimiento en SIN por igual lapso dio lugar a una recuperación en la viabilidad de aproximadamente 100 veces (fig. 19).

Conclusiones:

Como consecuencia de la incubación en medio de baja osmolaridad, la RIL de la cepa DA82 resulta seriamente inhibida. Esta inhibición puede ser superada llevando la osmolaridad a las condiciones normales mediante el agregado de 0,1 M NaCl.

La cepa DA78 no muestra alteraciones importantes en su RIL, con relación a la osmolaridad del medio, pues luego de dos horas de incubación, la recuperación observada en CON es 60% 1. veces mayor que la producida en SIN. Esta variación es despreciable si se la compara a la observada con DA82 en iguales condiciones, pues esta última recupera 63 veces más en CON que en SIN luego de dos horas de incubación.

Es necesario hacer notar que DA78 en CON no recupera tanto como DA82 en el mismo medio, y por lo tanto, no constituye la cepa control ideal. Lo más adecuado sería comparar una cepa silvestre con otra que estuviera afectada sólo en el carácter bac-. Sin embargo, dada la homología existente entre DA82 y DA78, los resultados pueden considerarse satisfactorios.

Los efectos producidos sobre DA82 por incubación en SIN, sugieren que como consecuencia de la mutación bac-, serían afectados los mecanismos implicados en la recuperación del daño originado por la radiación ultravioleta.

Figura 17.

Bacterias de la cepa D482, en fase logarítmica, fueron recolectadas por ultracentrifugación; el sedimento fue enjuagado y resuspendido con STN a una D.O.⁶⁵⁰ de aproximadamente 0,1; la suspensión se irradió con 540 erg/mm^2 (2537 \AA) y se dividió en dos alícuotas que se incubaron a 37°C con agitación, agregando previamente a una de ellas $0,1 \text{ m NaCl}$ (CON). A los tiempos indicados se tomaron muestras en las que se determinó la viabilidad efectuando recuento de colonias en cajas de agar nutritivo. La fracción sobreviviente se calculó con respecto al número de bacterias viables existentes al comienzo del experimento en una muestra sin irradiar.

Los valores graficados corresponden a la media entre los resultados de varios experimentos, indicándose también el error standard correspondiente, (el número de casos figura junto a cada punto).

DA82- Efecto de la osmolalidad del medio sobre la RIL

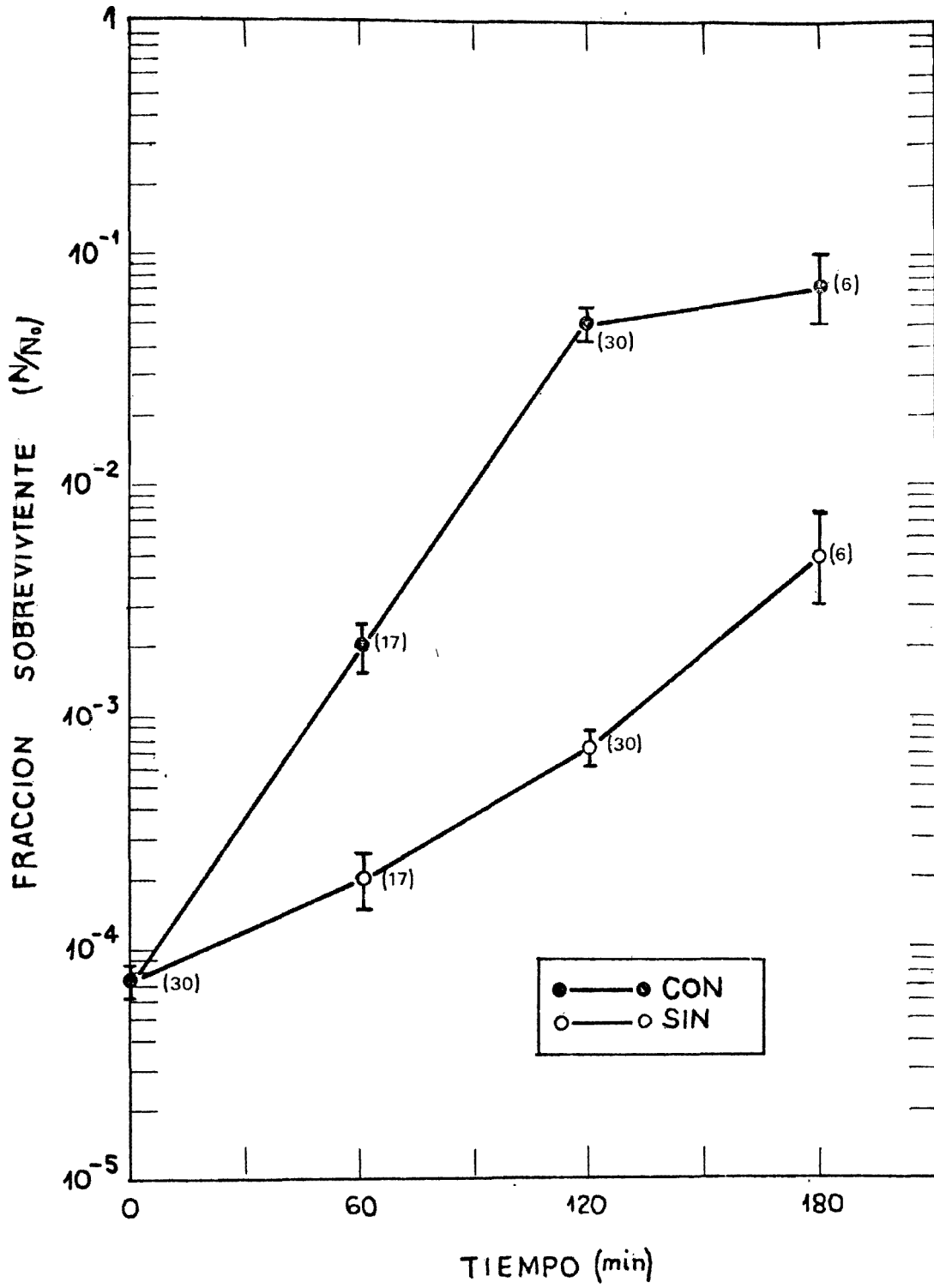


fig. 17

Figura 18

Se irradió una suspensión de bacterias de la cepa DA82 en medio SIN, que se preparó según se indica en la leyenda de la figura 17; dicha suspensión se dividió en dos alícuotas que se incubaron a 37°C con agitación, agregando a una de ellas NaCl 0,1 M (CON).

A los tiempos indicados con flechas, se separaron muestras de la alícuota en SIN, que se continuaron incubando previo agregado de 0,1 M NaCl. La visibilidad se determinó por recuento de colonias en cajas de agar nutritivo.

DA82- Reversibilidad de los efectos del medio SIN sobre la RIL

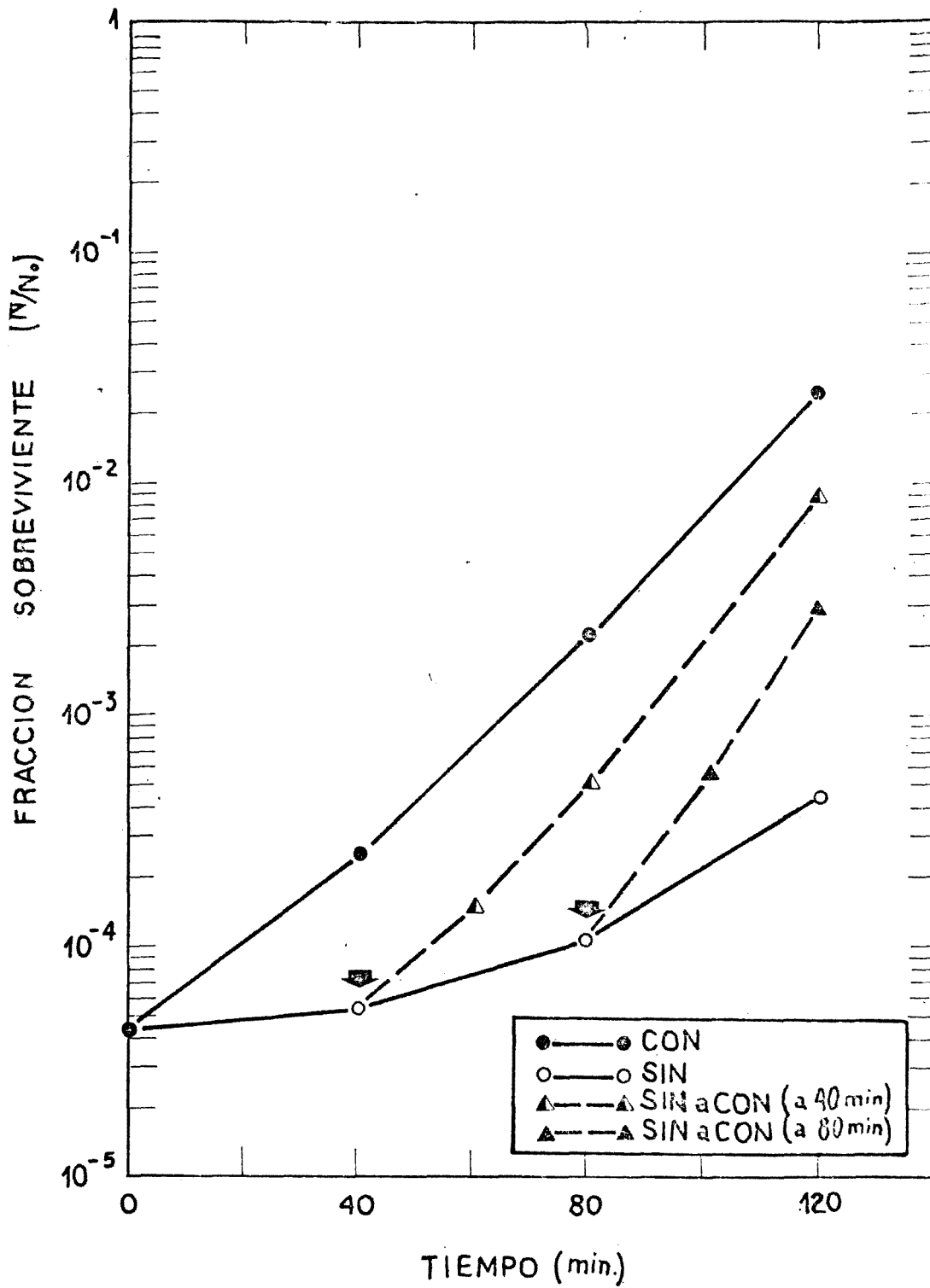


fig. 18

Figura 19.

Una suspensión de bacterias de la cepa DA78 en SIN, preparada como se indica en la leyenda de la figura 17, se irradió con 540 erg/mm^2 , y se dividió en dos alícuotas que se incubaron a 57°C con agitación, agregando a una de ellas NaCl $0,1 \text{ m}$ (0,9%). A los tiempos indicados se determinó la viabilidad por recuento de colonias en cajas de agar nutritivo.

2478- Efecto de la correlación del n. de salvas 1. III

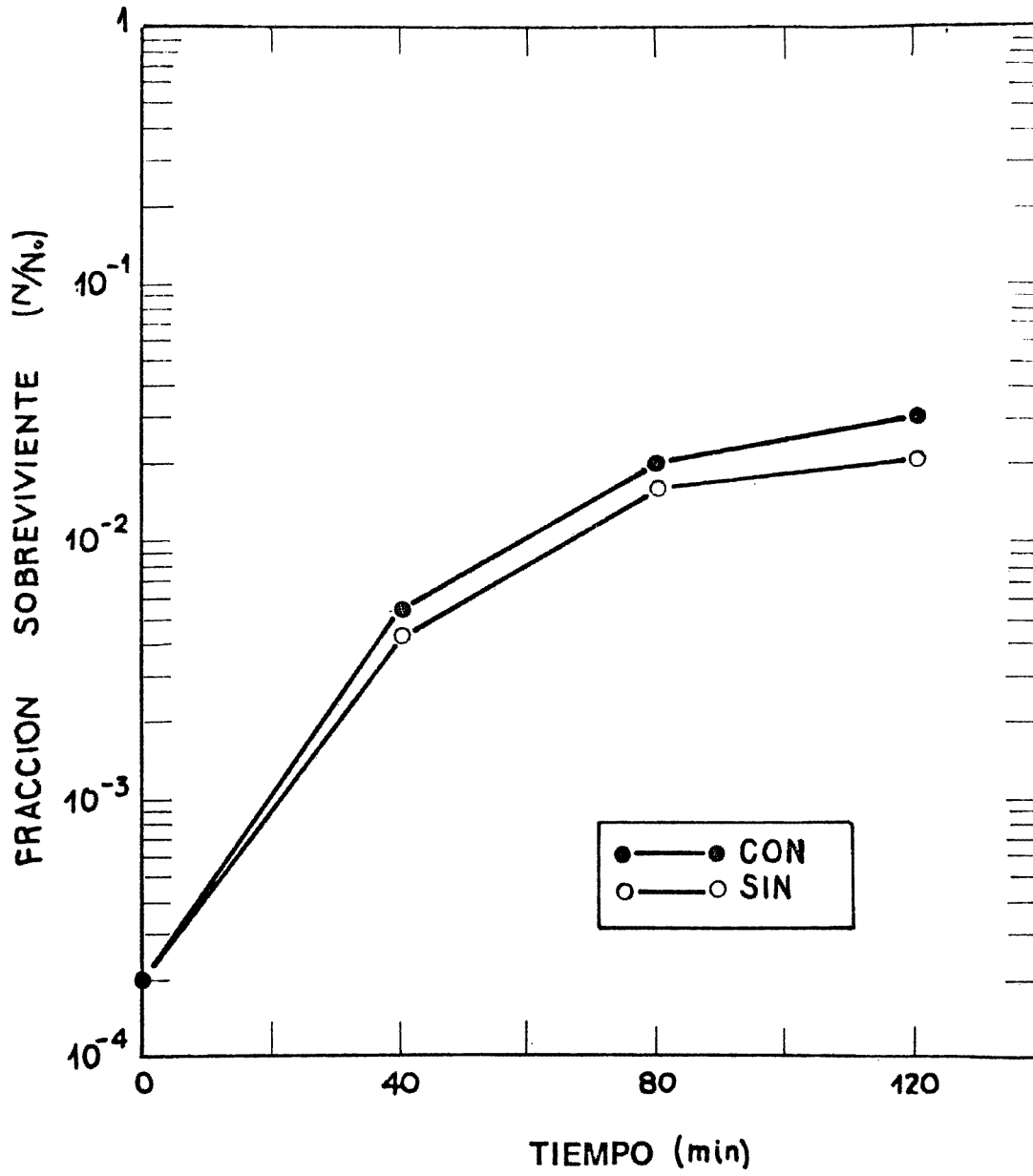


fig. 19

XI). Efecto de los inhibidores de la síntesis de macromoléculas sobre la RIL.

La incubación de bacterias de la cepa DA82 en medio SIN, produce, simultáneamente con la disminución de la capacidad de efectuar RIL, la inhibición de la síntesis de macromoléculas. (Ver Capítulo II).

Con el fin de explorar la posible relación entre esas dos respuestas a la incubación en SIN, se efectuaron experimentos para observar el efecto de diversos inhibidores de la síntesis de macromoléculas sobre la RIL. Se probó el efecto de: ácido nalidíxico, 2-fenil etanol, 5-fluor uracilo, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, y puromicina. Se efectuaron experimentos de RIL con cada una de esas sustancias en presencia y ausencia de glucosa al 0,1 % en el medio. Experimentos anteriores habían demostrado que en este sistema la glucosa tiene la propiedad de anular la RIL. (Ver Capítulo IX), y que este efecto puede ser revertido por algunas drogas (159). Dicho azúcar se utilizó para poner en evidencia diferencias en el comportamiento de los inhibidores estudiados.

Resultados:

Los inhibidores empleados pueden clasificarse en tres grupos en base a la respuesta provocada por su acción:

- 1). Puromicina, 5-fluor uracilo, y ácido nalidíxico: su presencia no modifica la RIL en CON, ni es capaz de cambiar el efecto inhibitorio de la glucosa que se manifiesta en CON-g. (Fig. 20a, 20b, 21a).
- 2). Cloranfenicol: deprime la RIL en medio CON hasta niveles similares a los observados en SIN. Esta respuesta es similar en apariencia a la que produce el agregado de glucosa a un cultivo en CON, sin embargo, aunque el cloranfenicol y la glucosa por

separado inhiben la RIL, cuando son agregados juntos no tienen ningún efecto sobre dicha función. Esta neutralización de efectos muestra que el modo de acción de ambas sustancias es distinto y antagónico (fig. 21). Tanto la tetraciclina como la eritromicina pertenecen a este grupo, aunque la intensidad de acción de ambas a las concentraciones usadas es menor que la observada con cloranfenicol (fig. 22a y 22b).

- 3). 2-fenil etanol: la incubación en presencia de esta droga, inhibe la RIL en medio CON hasta llevarla a los mismos valores encontrados en SIN; no obstante, a diferencia del cloranfenicol, el 2-fenil etanol no neutraliza la acción inhibitoria de la glucosa (fig. 23).

Conclusiones:

Entre los inhibidores probados, sólo el 2-fenil etanol logró mimetizar los efectos producidos sobre la RIL por la incubación en medio SIN. Esta droga actúa sobre la envoltura bacteriana causando un notable aumento de la permeabilidad (145), inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas (164); y disminuyen también la actividad respiratoria. (Ver Capítulo III); y la recuperación del daño por radiaciones (165), su acción sobre la RIL no es afectada por la presencia de glucosa en el medio. Todas estas manifestaciones muestran semejanza con las que resultan de incubar a DA82 en medio SIN. Esto señala la posible utilidad del 2-fenil etanol como herramienta para estudiar las alteraciones ocasionadas a DA82 en medio SIN.

No ocurre lo mismo con los otros productos probados, ya que o bien no muestran efecto alguno sobre la RIL, o si la inhiben, su acción es antagonizada por la presencia de glucosa, como ocurre en el caso del cloranfenicol.

Figuras 20, 21, 22 y 23.

Bacterias de la cepa DA82 en fase logarítmica (D.O.₆₅₀ 0,6-0,8) fueron recolectadas por centrifugación. El sedimento fue enjuagado con SIN y resuspendido en el mismo medio a una D.O.₆₅₀ 0,1.

La suspensión se irradió con una dosis de 540 erg/mm² y se dividió en alícuotas que se incubaron a 37°C con agitación. Las alícuotas designadas CON contenían además 0,1 M NaCl, y en los casos que correspondía alguno de los siguientes inhibidores a las concentraciones que se indican: ácido nalidíxico 15 µg/ml; 2-fenil etanol 0,25 % v/v; 5-fluor uracilo 50 µg/ml; tetraciclina 50 µg/ml; erotromicina 20 µg/ml; cloranfenicol 20 µg/ml y puromicina 67 µg/ml

En los casos que se indica se agregó 0,1 % de glucosa. Las alícuotas marcadas SIN fueron incubadas sin agregados.

La viabilidad se determinó por recuento de colonias sobre placas de agar nutritivo.

Efecto de inhibidores sobre la RIL a) ácido nalidixico
b) 5-fluor uracilo

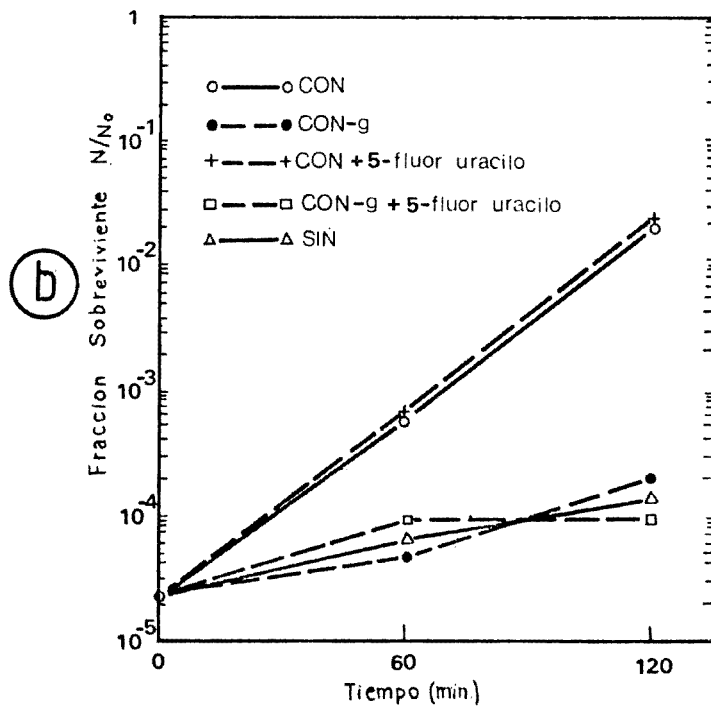
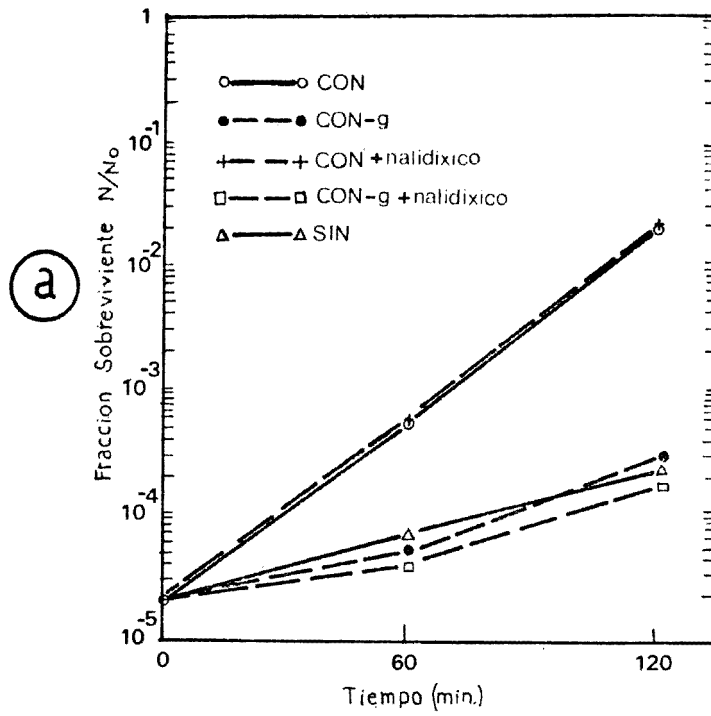


fig. 20

Efecto de inhibidores sobre la RIL: a) puromicina
b) cloranfenicol

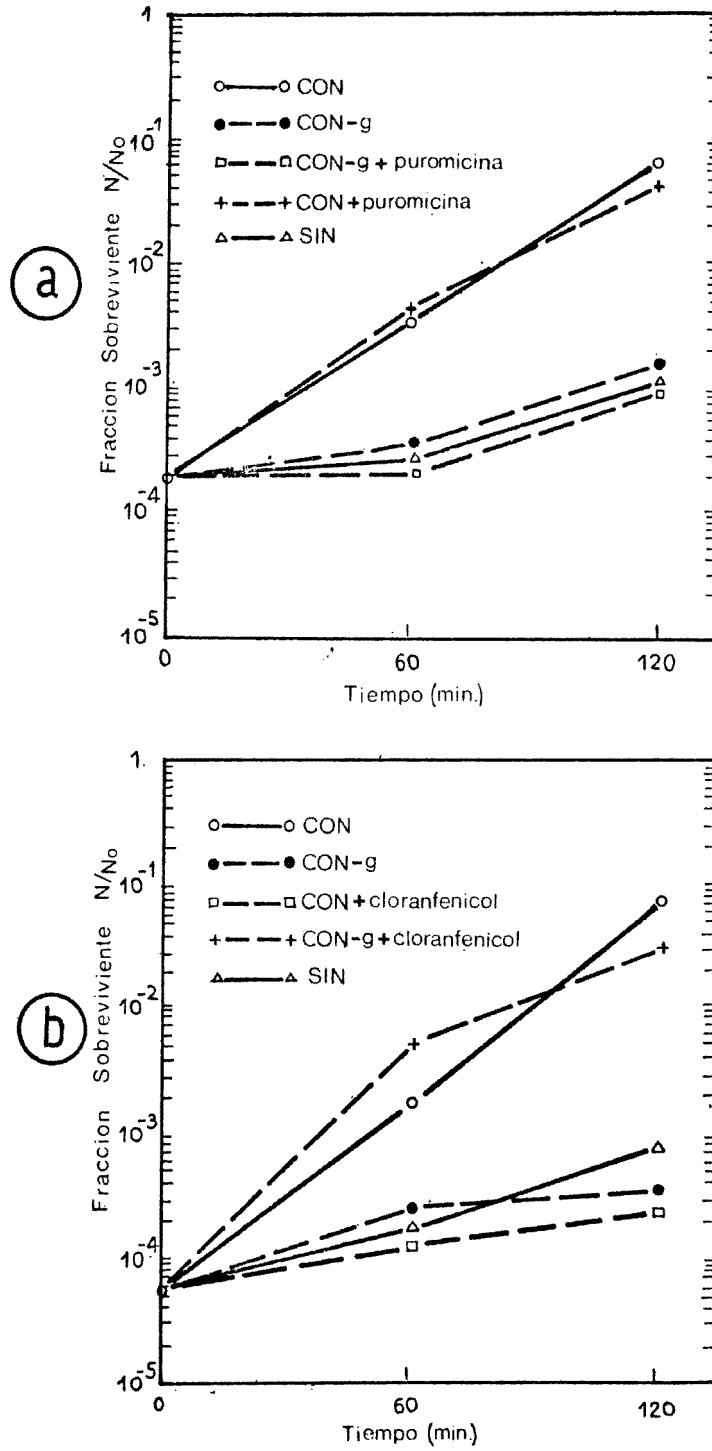


fig. 21

Efecto de inhibidores sobre la RIL: a) tetraciclina
b) eritromicina

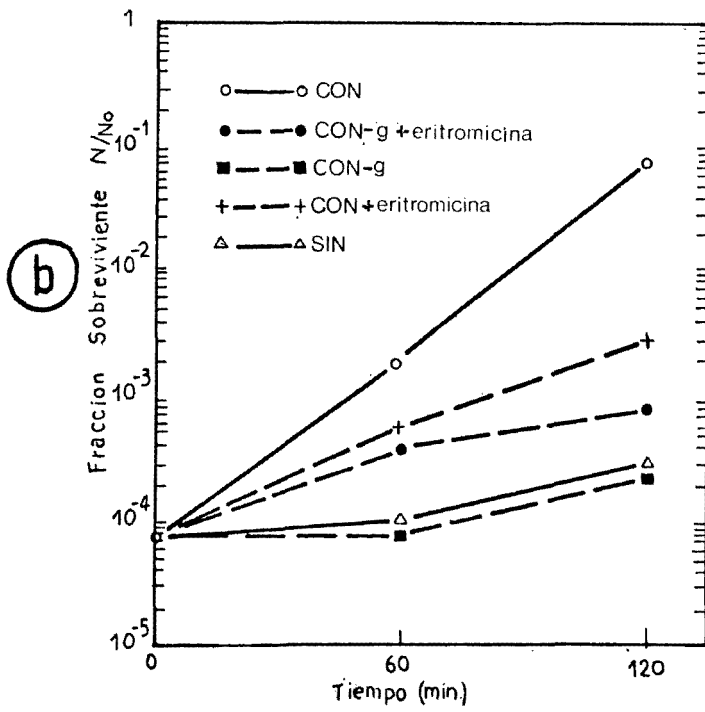
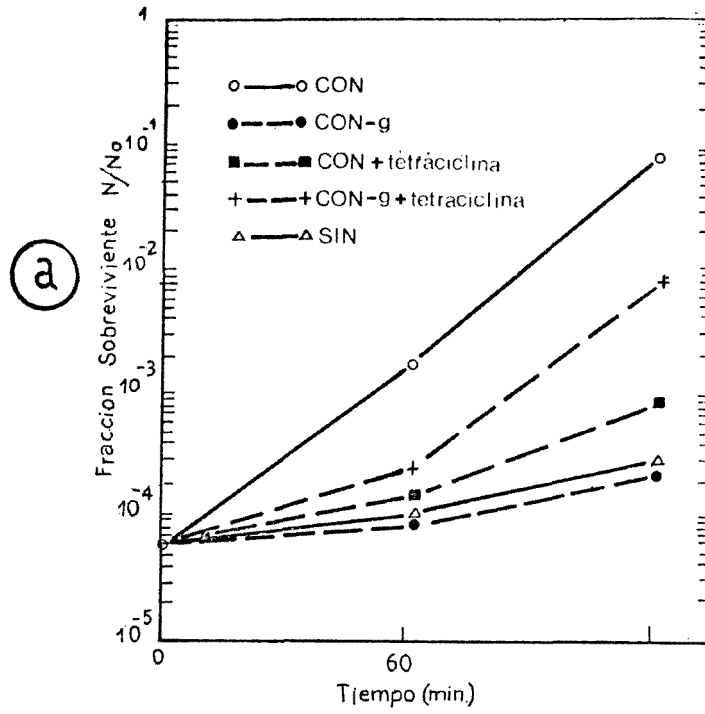


fig. 22

Efecto de inhibidores sobre la RIL: 2-fenil etanol

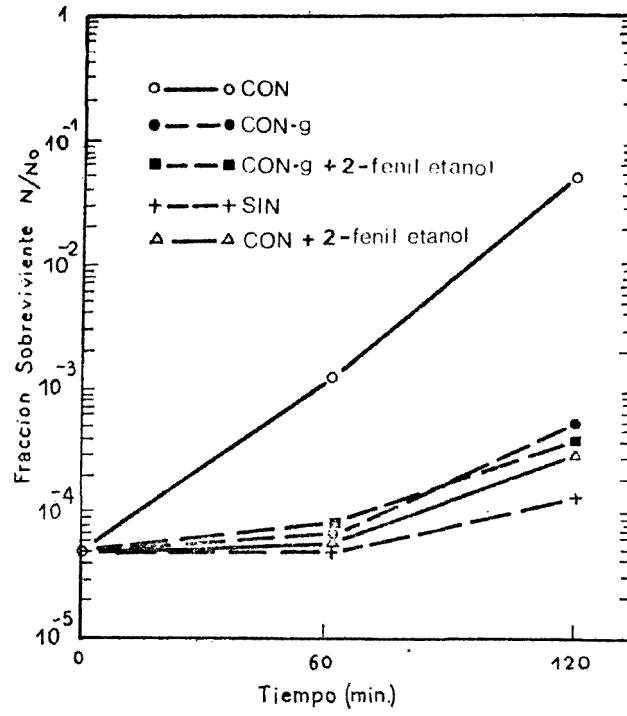


fig. 23

XII). Efecto de la osmolalidad del medio sobre la escisión de dímeros de pirimidina.

El hecho que DA82 demostrara poseer una menor capacidad para efectuar RIL en medio de baja osmolalidad, sugería que la osmolalidad del medio influye sobre el mecanismo de reparación por escisión.

Para obtener más información a ese respecto, se estudió la desaparición de dímeros de timina del ADN de bacterias irradiadas e incubadas en CON y SIN. Este parámetro refleja la actividad de las primeras etapas de dicho mecanismo de reparación.

Se efectuaron experimentos en los que células de DA82, marcadas en su ADN con timidina tritiada, fueron irradiadas con luz ultravioleta e incubadas en medios CON y SIN. El contenido de timina como dímero y como monómero fue determinado a distintos tiempos.

Las muestras se trataron con ácido fórmico en caliente; este procedimiento libera las bases del ADN sin afectar el anillo ciclobutano de los dímeros. El extracto obtenido se analizó por cromatografía en papel y la radioactividad se determinó con un espectrómetro de centelleo líquido.

Resultados:

En la figura 24 se muestra la variación del contenido de dímeros durante las dos horas posteriores a la irradiación con una dosis de 540 erg/mm^2 . El tratamiento de bacterias de la cepa DA82 con esa dosis, dio lugar a la transformación de un $0,29 \pm 0,03 \%$ de la timina de su ADN en dímeros.

Cuando luego de la irradiación las bacterias fueron incubadas en medio CON, el contenido de dímeros disminuyó exponencialmer

con una constante de desaparición $K_{CON} = 0,0223$, mientras que cuando la incubación se llevó a cabo en medio SIN, el contenido de dímeros, si bien disminuyó siguiendo una curva exponencial, lo hizo según una constante significativamente menor $K_{SIN} = 0,0107$.

Cuando las bacterias incubadas en SIN fueron llevadas a condiciones normales de osmolalidad mediante el agregado de 0,1 M NaCl, se pudo observar que la escisión se aceleró llegando a niveles similares a los de las bacterias incubadas en CON desde el comienzo del experimento. Para las bacterias llevadas a osmolalidad normal 40 minutos después de la irradiación, la nueva constante fue $K_{40} = 0,0259$, y para las transferidas de medio a los 80 minutos, $K_{80} = 0,0275$.

El número de bacterias viables siguió un patrón semejante al mostrado en la figura 18, aumentando más rápidamente en los cultivos que escindían dímeros con mayor eficiencia.

Conclusiones.

Si consideramos que el ADN de Salmonella tiene una longitud de aproximadamente 5×10^6 pares de bases (165) y que un 23,6 % de esas bases son timinas (166), podremos calcular en base a los resultados obtenidos, que cuando se irradia a DA82 con una dosis de 540 erg/mm^2 se forman aproximadamente $3,3 \times 10^3$ dímeros por cromosoma, lo que da una relación de 6 dímeros formados por cromosoma por cada erg/mm^2 suministrado; en la literatura figuran rendimientos de 5 a 9 dímeros por erg/mm^2 por cromosoma (167, 168, 67), por lo que los resultados obtenidos concuerdan con los de otros autores.

En medio CON, DA82 posee una capacidad normal de escisión, similar a la manifestada por otras bacterias (87, 73a); sin embargo, en medio de baja osmolalidad la escisión aparece significativamente disminuida. Esa baja velocidad de escisión manifestada en SIN

puede ser llevada a valores normales subiendo la osmolalidad del medio a los niveles de CON.

De los resultados obtenidos surge que la reparación por escisión en DA82 es osmosensible y sigue en líneas generales lo observado con la RII, apareciendo como el responsable más probable de la inhibición de la recuperación que tiene lugar en SIN.

Por otra parte, el hecho de que el paso de la reparación bloqueado en medio SIN sea la eliminación de dímeros, señala como sensible a la baja osmolalidad a alguna de las primeras etapas de la escisión (endonucleolisis o exonucleolisis).

Figura 24.

Se marcó con timidina tritiada a bacterias de la cepa DA82, incubándolas en fase logarítmica durante 4 ó 5 generaciones en medio E₅ (169) que contenía: glucosa (0,4 % p/v), adenosina (100 µg/ml), timidina metil H₃ (1,5 µg/ml; 6,7 µCi/µg). Las células se recolectaron por centrifugación y el sedimento fue enjuagado y luego resuspendido con medio SIN. Se ajustó la concentración a 10⁷ bacterias por ml, y se irradió con una dosis de 540 erg/mm².

La muestra irradiada se repartió en dos alícuotas, a una de ellas se agregó 0,1 m NaCl (CON) y la otra se utilizó sin agregados (SIN).

Se incubó a 37°C con agitación durante 2 horas. A los 40 y 80 minutos se transfirió parte del cultivo en SIN a otros recipientes donde se continuó la incubación, previo agregado de 0,1 m NaCl.

A los tiempos indicados se tomaron muestras conteniendo entre 2 y 3 x 10⁸ bacterias, sobre las que se determinó el contenido de timina como monómero y como dímero. Para ello se hidrolizó el ADN con ácido fórmico al 98 % según la técnica de Setlow (87

Se separó dímero de monómero por cromatografía en papel siguiendo la técnica de Wulff (170). La actividad de las fracciones se midió utilizando un espectrómetro de centelleo líquido.

Los datos obtenidos se ajustaron por regresión a una función exponencial.

Cepa DA82: Escisión de dímeros de timina en CON y SIN

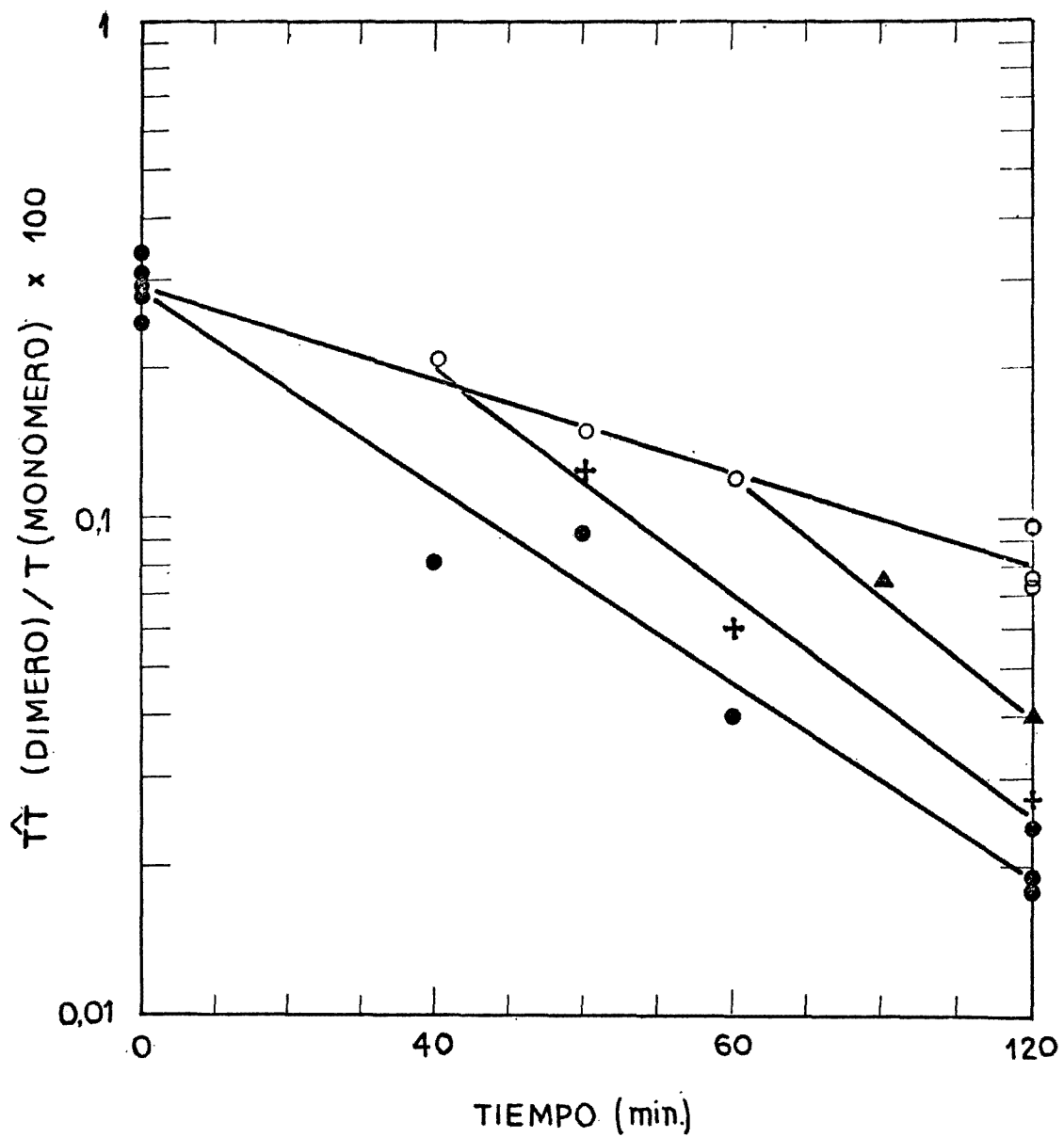


fig. 24

XIII). Sedimentación del ADN de DA82 en gradientes alcalinos de sacarosa.

Las bacterias de la cepa DA82 incubadas en SIN eliminan los dímeros de timina más lentamente que aquellas en CON. Esto indica que el choque hiposmótico disminuye la capacidad de esta cepa para realizar reparación por escisión, y sugiere que la osmosensibilidad radicaría en alguna de las dos primeras etapas de este proceso.

Para tratar de identificar la naturaleza de la etapa afectada se efectuaron experimentos de ultracentrifugación en los que se siguió la sedimentación del ADN a través de gradientes alcalinos de sacarosa.

En esas condiciones, al separarse las bandas del ADN a causa del elevado pH, es posible apreciar la formación de cortes de una sola banda producidos por efecto de la actividad de los mecanismos de reparación. Dichos cortes se hacen aparentes al causar la disminución de la velocidad de sedimentación del ADN.

Resultados:

En la figura 25a, puede observarse que a tiempo cero se produjo una pequeña disminución en la distancia de sedimentación del ADN de las bacterias irradiadas, con respecto al control sin irradiar.

Esto era esperable, ya que es sabido que la radiación ultravioleta origina cortes simples con una eficiencia muy baja (67), y por otra parte, aún no había transcurrido tiempo suficiente para que se cumplieran procesos de escisión.

Luego de 60 minutos de incubación se evidenció una disminución en la distancia de sedimentación, que se manifestó en las bacterias incubadas en SIN con igual extensión que en aquellas mantenidas en CON (fig. 25b), y correspondería a la formación de una cantidad similar de cortes en ambos casos.

A los 120 minutos de la irradiación (fig. 25c), las bacterias incubadas en CON presentaron un aumento en la distancia de sedimentación de su ADN, lo que implicaría una disminución del número de cortes en el genoma, mientras que aquellas en SIN no exhibieron cambios con respecto a lo mostrado a los 60 minutos.

Conclusiones:

La semejanza existente entre la cantidad de cortes detectados una hora después de la irradiación en el ADN de las bacterias incubadas en CON y SIN, indicaría que la etapa de incisión se cumple probablemente en forma independiente de la osmolaridad del medio. Por exclusión, se puede inferir entonces que el paso afectado en medio SIN sería la exonucleólisis.

Estos resultados parecen contradecirse con los obtenidos al analizar la desaparición de dímeros, puesto que si la incisión se continuará llevando a cabo mientras que la exonucleólisis permanece detenida, se esperaría encontrar una acumulación de los cortes originados a consecuencia de la iniciación de procesos de reparación incompletos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la enzima responsable de la etapa exonucleolítica es probablemente la polimerasa I, y que sus funciones podrían ser reemplazadas, aunque con menor eficiencia, por las polimerasas II y III (171, 172). Esta substitución justificaría que con los procedimientos utilizados no se detecte en SIN una mayor acumulación de cortes que en CON.

Deba considerarse también, la posibilidad que la incubación en SIN inhiba en proporciones similares a las dos primeras etapas de la reparación por escisión; esto daría como resultado un cuadro de aparición de cortes y eliminación de dímeros semejante al observado.

La persistencia de los cortes producidos en el ADN de las bacterias incubadas en SIN hasta dos horas post-irradiación, mientras que luego de igual período en CON, dichos cortes tienden a desaparecer; se debería a que la incubación en medio de baja osmolaridad durante ese lapso, no es suficiente para que la reparación llegue a completarse.

Figura 25.

Las bacterias se marcaron por crecimiento, durante 3-4 tiempos de generación, en medio: *Er* (169) suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Adenosina y 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de timidina metil H3 con una actividad de 33 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Las células fueron recolectadas por centrifugación, el sedimento fue enjuagado y resuspendido con SIN, irradiándose en forma habitual con una dosis de 540 erg/mm^2 . Las alícuotas irradiadas se incubaron a 37°C con agitación, directamente (SIN) o agregando 0,1 M NaCl (CON). A tiempos prefiados se tomaron muestras; las células fueron recolectadas por centrifugación en frío (4-5°C) y convertidas en esferoplastos por tratamiento con lisozima EDTA (173). Aproximadamente 5×10^6 células fueron sembradas sobre cada gradiente de sacarosa (lineal de 5 a 20 %), que contenía además 0,7 M NaCl; 0,3 M NaOH y 1 mM EDTA; y sobre el que se había depositado una capa de 0,1 ml de 0,5 M NaOH.

Los gradientes una vez sembrados se dejaron reposar por 15 a 30 minutos, y se centrifugaron en el rotor SW-65 T1 de una ultracentrífuga SPINCO L 2-50B, durante una hora a 40.000 r.p.m.

Los gradientes se fraccionaron mediante una jeringa mecánica ISCO, y se recolectaron en discos de 24 mm de diámetro confeccionados con papel Watman 3 MM. La serie de muestras obtenidas se dejó secar, los discos se lavaron con ácido tricloroacético al 3 % por 3 veces, una vez con alcohol, y finalmente una vez con acetona. La radioactividad se determinó con un espectrómetro de centelleo líquido utilizando un líquido con base de tolueno.

Los resultados se corrigieron sustrayendo las muestras de fondo, se delimitó la zona correspondiente al pico de sedimentación (flechas finas en ángulo recto) y se calculó la distancia

media recorrida por dicho pico aplicando la fórmula $\bar{d} = \sum d_i \cdot C_i$, donde d_i representa la distancia recorrida por la fracción i , y C_i el número de cuentas correspondiente a esa fracción expresada como fracción de las cuentas totales (174). Las flechas gruesas indican la \bar{d} correspondiente a cada pico.

Gradientes alcalinos de sacarosa

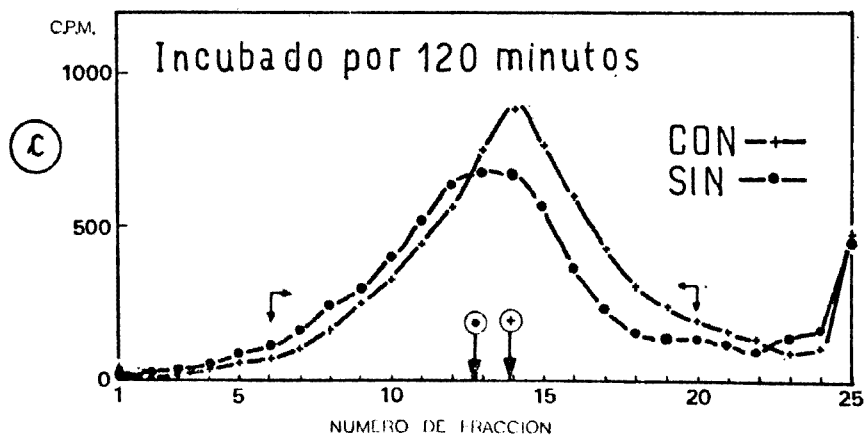
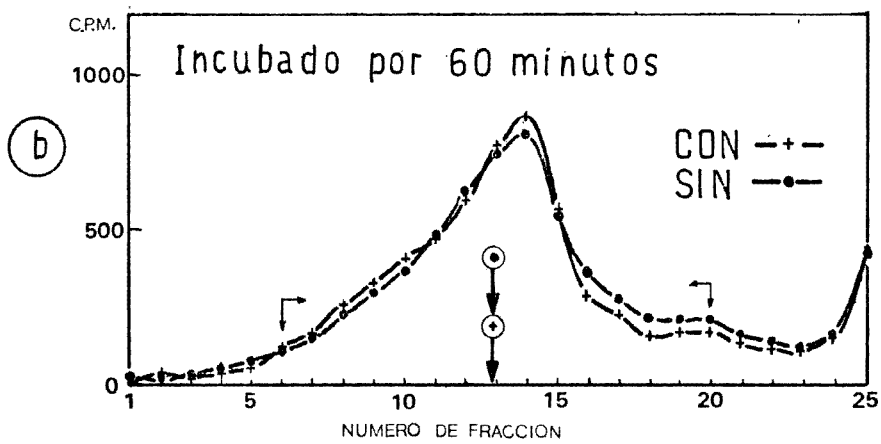
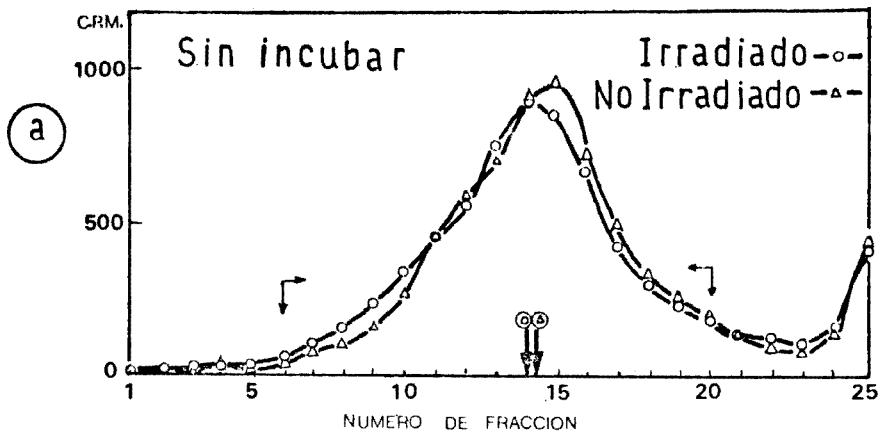


fig 25

XIV). Efecto de la osmolalidad del medio sobre la reparación por foto-reactivación.

Cuando las bacterias de la cepa DA82 son irradiadas con luz ultravioleta (2537 Å), y mantenidas posteriormente a 37°C durante 2 horas, la cantidad de células viables luego de ese período, varía notablemente dependiendo de que la incubación se efectúe en medio CON o SIN.

Esto se debe posiblemente, a que en medio CON los dímeros son escindidos más rápidamente que en SIN. De acuerdo a esta hipótesis, si se eliminaran los dímeros del ADN, se debería obtener iguales niveles de sobrevivencia en CON y en SIN.

Mediante el tratamiento con luz fotorreactivante (3600 Å) se puede volver al estado de monómero una elevada proporción de los dímeros de pirimidina. Este procedimiento, que no afecta la integridad del ADN, pues actúa directamente sobre el anillo ciclobutano mediante un mecanismo fotoenzimático. (Ver Introducción), se utilizó para investigar la relación entre el contenido de dímeros, y la diferencia de viabilidad existente a las 2 horas post-irradiación entre las bacterias incubadas en CON y SIN.

Resultados:

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos.

Las bacterias mantenidas en CON durante 2 horas post-irradiación tuvieron una fracción sobreviviente de 9×10^{-2} , mientras que para aquellas incubadas en SIN la fracción sobreviviente sólo alcanzó a $1,8 \times 10^{-3}$.

El tratamiento con luz fotorreactivante dio lugar a que, tanto las células en CON como aquellas en SIN presentarán una sobrevivencia equivalente que fue de $2,9 \times 10^{-1}$ y 3×10^{-1} respectiva-

TABLA 6

MEDIO DE INCUBACION	FRACCIÓN SOBREVIVIENTE A TIEMPO CERO	FRACCIÓN SOBREVIVIENTE [DOS HORAS A 37°C]	FRACCIÓN SOBREVIVIENTE [DOS HORAS A 37°C Y FOTO-REACTIVACION]
SIN	$1,3 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-3}$	3×10^{-1}
CON	$1,3 \times 10^{-4}$	$9,3 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-1}$

Foto-reactivación

Una suspensión en medio SIN de bacterias de la cepa DA82 en fase logarítmica, que contenía aproximadamente 5×10^7 bacterias/ml, fue irradiada con una dosis de 540 erg/mm^2 . La muestra irradiada se dividió en dos alícuotas que se incubaron a 37°C con agitación. Una de estas alícuotas fue adicionada de $0,1 \text{ m NaCl}$ (CON), la otra se incubó sin ningún agregado (SIN).

Luego de 100 minutos se transfirió una parte de cada alícuota a vasos cilíndricos tapados con placas de vidrio plano, en los que la suspensión ocupaba una capa de 3 mm de altura; estas muestras fueron tratadas durante 20 minutos con una lámpara Phillips HPR de 125 W, situada a 15 cm sobre las mismas. Durante ese período se continuó la incubación manteniendo las mismas condiciones de agitación y temperatura.

Al cumplirse los 120 minutos de la irradiación, se determinó el número de bacterias viables por recuento de colonias en placas de agar nutritivo.

XV). Efecto de la osmolalidad del medio sobre la resistencia a radiación Gamma.

Cuando las bacterias son tratadas con radiaciones ionizantes, bajo condiciones aeróbicas y en medio que no permiten crecimiento, la mayoría de las lesiones son enmendadas mediante el uso parcial del mecanismo de reparación por escisión. (Ver Introducción).

Con el propósito de examinar el efecto de la osmolalidad del medio sobre la reparación por escisión de las lesiones causadas por las radiaciones ionizantes, se efectuaron experimentos en los que se determinó la sensibilidad de las cepas DA82 y DA78 frente a la radiación Gamma emitida por una fuente de Co-⁶⁰, y la influencia que tenía el medio en que estaban suspendidas las bacterias sobre dicha sensibilidad.

Resultados:

Se observó que para ambas cepas la sensibilidad era mayor cuando la irradiación se llevaba a cabo en medio SIN. No obstante este efecto fue mucho más intenso para DA82, pues cuando se irradiaron bacterias de esta cepa mantenidas en SIN, la dosis necesaria para lograr una sobrevivencia del 37 % fue un 60 % inferior a la empleada en medio CON (fig. 26), mientras que para DA78, la dosis letal 37 en medio SIN se redujo tan solo un 10 % respecto a CON (fig. 27).

Conclusiones:

La mayor sensibilidad frente a la radiación Gamma que presentan las bacterias de la cepa DA82 cuando se las suspende

en medio SIN, sugiere que la eficiencia con que este mutante repara el daño causado por las radiaciones ionizantes, es afectada por la osmolalidad del medio.

El análisis de los resultados obtenidos al examinar los efectos de la radiación ultravioleta sobre DA82, indica que el nivel afectado en medio SIN sería la exonucleólisis, y descarta la posibilidad de que los pasos de repolimerización y ligado estén implicados en el problema.

Al excluir la endonucleólisis, debido a la naturaleza de las lesiones, los resultados obtenidos con radiación Gamma coinciden en señalar también que el paso de la escisión sensible a la osmolalidad sería la exonucleólisis.

Figuras 26 y 27.

Se prepararon suspensiones de bacterias en fase logarítmica, a una concentración aproximada de 10^7 bac/ml, utilizando medios CON y SIN.

Las suspensiones fueron mantenidas en hielo e irradiadas con una fuente de Co^{60} , suministrando dosis fraccionadas en 3-4 veces, desde 0 a 36 krad. Luego de cada dosis se tomaron muestras en las que se determinó el número de bacterias viables por recuento de colonias en placas de agar nutritivo.

Sensibilidad a radiación Gamma (Cepa DA82)

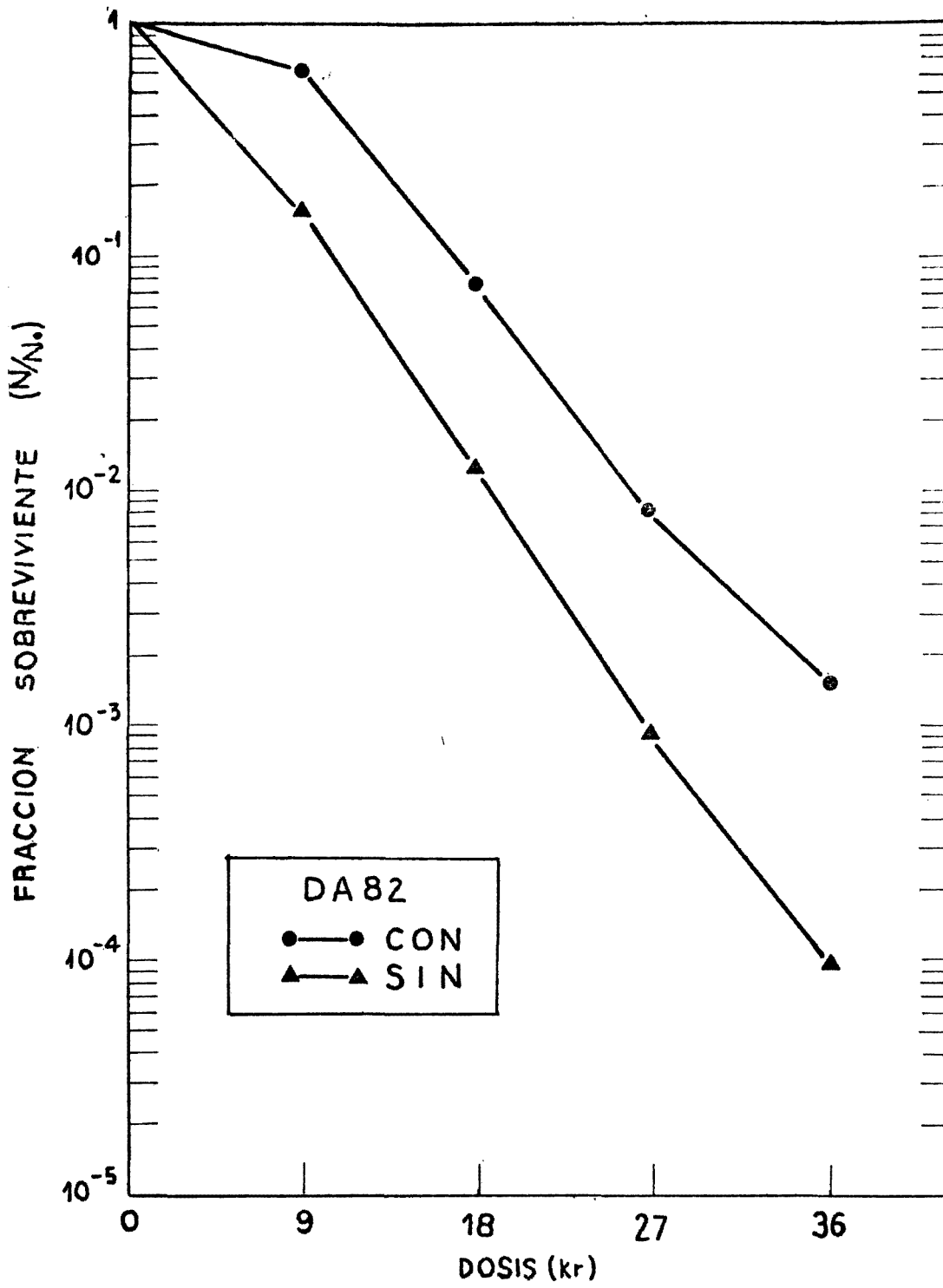


fig.26

Sensibilidad a radiación Gamma (cepa DA78)

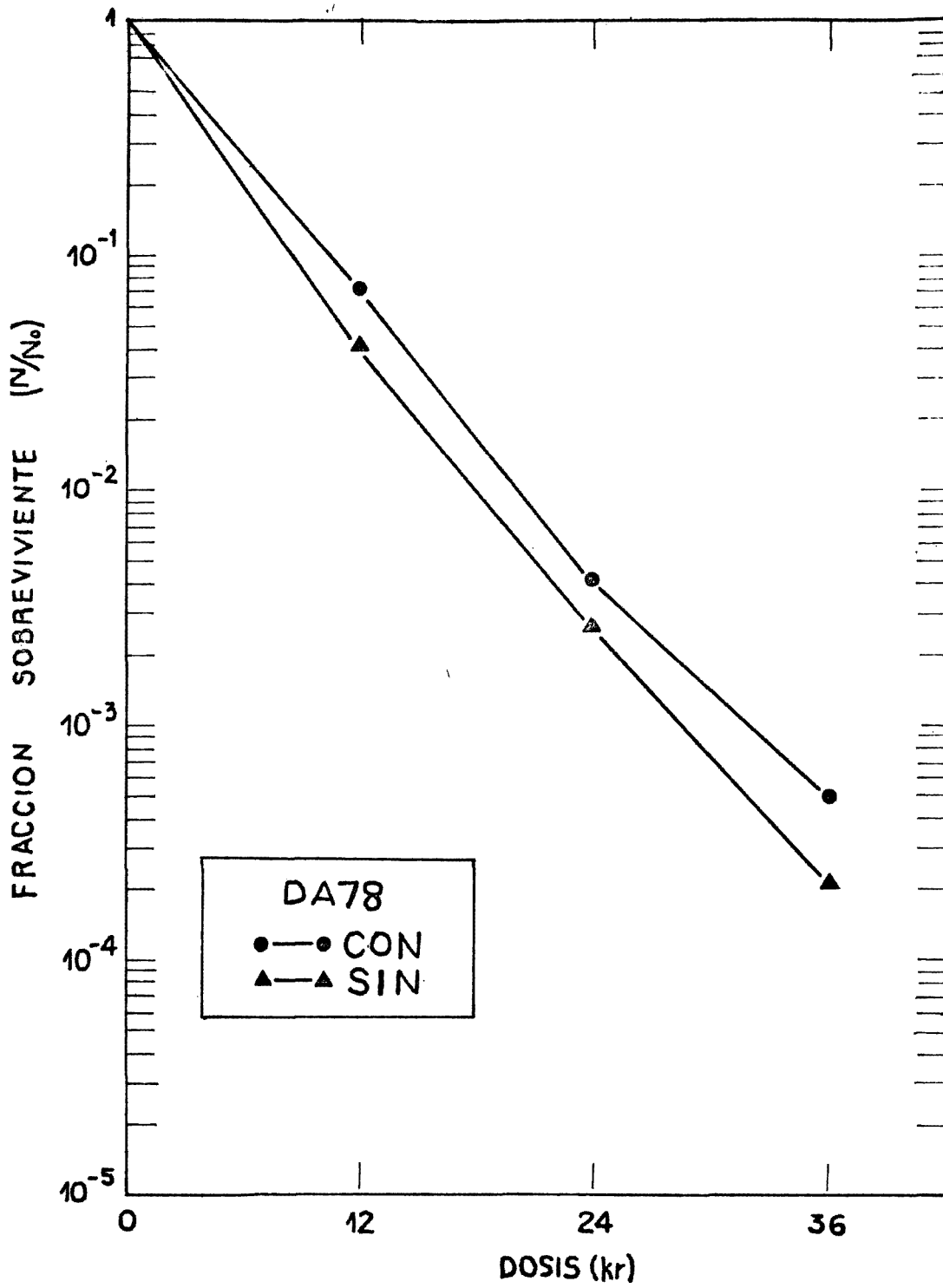


fig. 27

DISCUSSION

Discusión:

El efecto del choque hiposmótico sobre bacterias Gram negativas de tipo silvestre ha sido estudiado con cierto detenimiento (175, 176). Dicho tratamiento remueve una variedad de sustancias del interior de las células. Esta pérdida es relativamente inespecífica (176), y se produce presumiblemente a través de poros originados o agrandados por la tensión que impondría a la envoltura la diferencia en actividad del agua entre ambos lados de la membrana.

El cambio originado por el choque hiposmótico es de tal naturaleza que resulta en un fenómeno reversible, y que responde en gran parte a procesos de regulación del equilibrio osmótico (16).

En efecto, la eliminación del contenido celular se detiene cuando las bacterias adquieren la condición de osmolalidad interna de equilibrio, que resulta en general superior a la del ambiente que las rodea (23). Esto asegura entre otras cosas un estado de turgencia que favorece la permanencia de la membrana citoplasmática en estrecho contacto con la pared celular que la rodea. Esta condición es esencial para la síntesis de la pared, y para la división celular (175, 177).

En DA82, los resultados del choque hiposmótico revisten características muy particulares, principalmente en lo referido a la variedad de funciones celulares que se ven afectadas por ese tratamiento.

Dos razones hacen pensar que la membrana de DA82 perdería en medio SIN su capacidad para actuar como barrera de permeabilidad. Una de ellas es el exagerado aumento en la captación de acriflavina que causa el choque hiposmótico. La otra surge de considerar los resultados obtenidos al dosar succinico deshidrogenasa. En bacterias

enteras de cepas no osmosensibles, esta actividad es independiente de la osmolalidad del medio, mientras que en lisados de las mismas, varía de acuerdo a que la determinación se efectúe en CON o SIN. No ocurre lo mismo con DA82, puesto que en esta cepa la actividad de succínico deshidrogenasa es influenciada por la osmolalidad, tanto en células enteras como en lisados. La actividad de esta enzima en células enteras de DA82 respondería entonces al patrón registrado en cepas no osmosensibles cuando se quiebra la continuidad de la envoltura mediante lisis por ultrasonido.

La pérdida de la capacidad para controlar la permeabilidad pasiva a iones y pequeñas moléculas no parece hacerse extensiva al transporte activo. La habilidad de DA82 para captar leucina en medio SIN, fue similar a la de las bacterias de tipo silvestre.

La actividad respiratoria de DA82 es también afectada por la osmolalidad, y la incubación en medio SIN-g causa una importante reducción en el consumo de oxígeno por esta cepa.

El tratamiento hiposmótico produce también la detención del crecimiento y la división celular, e inhibe la síntesis de macromoléculas. Este comportamiento se asemeja mucho a la "respuesta estricta" que manifiestan las bacterias normales ante la falta de un aminoácido (178, 179). Sin embargo, los procesos generados en DA82 a consecuencia del choque hiposmótico no parecen responder a este mecanismo, debido a que no van acompañados por el aumento de guanosín tetrafosfato, y guanosín pentafosfato característico de esa respuesta (143).

El cuadro de resistencia a radiación ultravioleta que se desarrolla por incubación en SIN-g, corresponde al descrito en bacterias que cesan de replicar su ADN a nivel de iniciación (185). La elevación de los niveles de resistencia se adjudica en este caso a que las bacterias en reposo repararían su ADN mejor que aquellas en división (186). Esta consecuencia de la incubación en SIN-g

es una prueba indirecta de que el choque hiposmótico afecta la iniciación de la replicación. La cinética de incorporación de timina tritiada en ese medio, coincide con la que debería esperarse de mediar tal comportamiento. Varias son las causas que pueden afectar este paso de la replicación. Es factible que el fenómeno observado sea un efecto secundario de la inhibición de la síntesis de proteínas que tienen lugar en SIN-g.

Debe considerarse también la posibilidad de una alteración en el complejo de iniciación, esta podría originarse en los cambios que sufriría la membrana en medio SIN-g.

Los efectos de la osmolalidad del medio sobre la RIL merecen una atención especial. Son varias las consideraciones que indican que el mecanismo de reparación por escisión sería el responsable de dichos efectos:

- 1). En las condiciones experimentales utilizadas, la escisión es el único mecanismo de reparación que puede actuar.
- 2). La RIL es una expresión de la reparación por escisión.
- 3). La eliminación de dímeros de timina en medio SIN es significativamente menor que en CON. Existe un acentuado paralelismo entre el aumento de la viabilidad y la desaparición de dímeros, y cuando se agrega 0,1 m NaCl a las bacterias en SIN los dos parámetros cambian simultáneamente.
- 4). Suprimiendo los dímeros por foto-reactivación se nivela la diferencia de viabilidad existente entre las bacterias sometidas a RIL en CON y SIN.

Teniendo en cuenta que la incubación en SIN da lugar a la acumulación de dímeros, puede estimarse que la escisión debe ser afectada por el medio en alguna de las etapas previas a la remoción de esos fotoproductos. El estudio de la sedimentación del ADN en gradientes alcalinos de sacarosa indica que la formación de cortes, que caracteriza al primer paso de la escisión, no dependería de la osmolalidad. Se debe esperar entonces que el paso osmosensible sea el segundo, que tiene lugar cuando los dímeros y algunos nucleótidos adyacentes son escindidos mediante un ataque exonucleolítico.

Esta conclusión resulta parcialmente alentada por los resultados obtenidos al probar el comportamiento de DAS2 frente a radiación Gamma. En las condiciones experimentales utilizadas, la reparación de ese daño corresponde al mecanismo de escisión.

La diferente sobrevivencia obtenida en CON y SIN sugiere que también en este caso la escisión resulta afectada por la osmolalidad. La variación de la respuesta a la osmolalidad del medio no es tan importante como la que se presenta con ultravioleta. Esto se debe a que en esta ocasión no se buscaron las condiciones óptimas para la expresión de la recuperación. El daño más significativo que provoca la radiación ionizante es la formación de cortes simples en el ADN.

Debido a su naturaleza, la reparación de esas lesiones no necesitaría de la etapa de incisión. Por lo tanto, puede descartarse la intervención de esta etapa en la osmosensibilidad de la reparación.

La producción de macromoléculas resulta muy perturbada por el choque hipoosmótico. Si los problemas que se manifiestan en la reparación derivan de la inhibición de la síntesis de macromoléculas

sería posible alterar el curso de la misma utilizando drogas que afectan esas síntesis. Tan solo el 2-fenil etanol fue eficaz para reproducir los efectos del choque hiposmótico sobre la RIL. Esta droga tiene la propiedad de alterar la membrana en forma reversible (145), como consecuencia de esa modificación aumenta la permeabilidad, detiene la iniciación de nuevos ciclos de replicación, inhibe la reparación del daño producido por radiaciones ionizantes (187), afecta la síntesis de ARN y proteínas (164), y deprime la actividad respiratoria. (Ver Capítulo III). El resto de los inhibidores probados no actuó sobre la RIL, o lo hizo a través de mecanismos diferentes al que operaría en medio de baja osmolalidad.

Hasta el momento no existen evidencias que indiquen la existencia de un requerimiento de síntesis de ADN, ARN o proteínas para que la reparación por escisión se lleve a cabo (108, 109). Los efectos causados por el tratamiento con 2-fenil etanol deberían adjudicarse a las alteraciones producidas por esta droga sobre la envoltura, más que a su efecto sobre la síntesis de macromoléculas.

No es posible explicar por el momento el efecto depresor de la RIL que ejerce el CAF, ni el antagonismo que presentan éste y otros antibióticos frente a la glucosa. Es poco probable que estas respuestas impliquen una relación directa con la reparación.

Las consecuencias observadas podrían deberse a la alteración del balance entre los procesos de reparación y síntesis. Esta relación contribuye en forma secundaria a la supervivencia de las bacterias injuriadas.

Otro de los procesos afectados por la osmolalidad es la respiración. Los inhibidores de la actividad respiratoria y los desacoplantes de la fosforilación oxidativa deprimen la recuperación del efecto de las radiaciones (181) al inhibir los mecanismos de

recombinación. Sin embargo, resulta poco probable que el choque hiposmótico afecte la reparación por esa vía. Las condiciones utilizadas no permiten que la recombinación se exprese.

El elemento común entre las diversas modificaciones producidas en SIN, es la probada o supuesta relación de todas las funciones celulares alteradas con la membrana citoplasmática. Al ser transferida de SIN a CON, DA82 se recupera rápidamente. La reversión de los efectos del choque hiposmótico no parece requerir actividad metabólica, ni síntesis reparativa. Esto sugiere que el cambio inducido por la baja osmolalidad no sería de origen fisiológico, sino que se debería a un proceso físico. La membrana citoplasmática constituye una estructura adecuada para sufrir una transformación de ese tipo (145). Sin embargo, la membrana de DA82 parece no estar alterada, al menos en cuanto a las proteínas que la componen.

El análisis de esta capa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no mostró diferencias entre un mutante bac - y la cepa silvestre.

El origen de la osmosensibilidad de DA82 radicaría probablemente a nivel de la pared celular, que en esta cepa muestra una elasticidad inusual (1). Las tensiones originadas en la excesiva dilatación que sufren estas células en SIN, podrían llevar a un cambio en la conformación normal de la membrana. Si este fuera el caso, las respuestas observadas podrían interpretarse en base a alguna de las siguientes hipótesis:

- 1). Las modificaciones que tienen lugar en SIN pueden deberse a una relación directa entre los procesos afectados y la membrana.
- 2). Los fenómenos observados serían el resultado de un efecto indirecto. Este podría originarse por la pérdida, a través de la

membrana, de iones y pequeñas moléculas necesarias para la actividad celular.

La membrana podría retornar a su configuración inicial al normalizarse la osmolalidad del medio, y los desórdenes causados por el choque hiposmótico se superarían rápidamente.

La pared celular está compuesta por dos capas: la membrana interna y el complejo de mureína y lipoproteína. Una de las proteínas minoritarias de la membrana externa sería afectada por la mutación bac -, sin embargo esto no parece alterar sus propiedades. Esta capa conserva sus funciones como barrera de permeabilidad (1), y tiene un LPS que responde normalmente a ensayos serológicos (1), y confiere a esta membrana propiedades electroforéticas normales. (Ver Capítulo VII) (157).

Por otra parte, la interacción de la membrana externa en el mantenimiento de la rigidez de la envoltura es muy dudosa.

En general, se adjudica a la mureína la principal responsabilidad de esa función. En DA82 está aumentada la sensibilidad a antibióticos que interfieren con la síntesis de esa macromolécula (1). Es posible que las propiedades de esta cepa se deban a la presencia de una mureína modificada, de estructura excesivamente elástica (1).

Las modificaciones causadas en el curso de la reparación por la incubación en SIN, responden a un patrón semejante al de las otras perturbaciones originadas por el choque hiposmótico, y sugieren la existencia de algún tipo de relación entre la membrana y los mecanismos de reparación. Esta podría ser de naturaleza directa, y deberse a una relación funcional entre la membrana y las enzimas de escisión, o bien corresponder a una dependencia indirecta.

Una posibilidad que responde a esta última alternativa, surge al considerar el gran aumento de permeabilidad que parece ocurrir en medio SIN. Debido al mismo, DA82 podría perder su capacidad de regular el medio intracelular. Los problemas manifestados en SIN, serían, de acuerdo a esta hipótesis, originados por un cambio desfavorable en el ambiente iónico intracelular.

Ese parámetro juega en muchos casos un papel importante en la regulación de sistemas enzimáticos (183, 184).

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales;

La cepa DA82 de *Salmonella typhimurium* posee una mutación que afecta su envoltura, confiriéndole una pared celular sumamente elástica, que sería la responsable de su forma esférica y de los grandes cambios de volumen que experimenta cuando varía la osmolalidad del medio (1).

A consecuencia del excesivo hinchamiento que se produce en un medio de baja osmolalidad, la membrana de DA82 sufriría cambios reversibles en su estructura. Como resultado de esos cambios se modificarían una serie de funciones celulares.

El choque hiposmótico detiene la división y el crecimiento, impide la iniciación de nuevos ciclos de replicación del ADN, deprime la actividad respiratoria, aumenta la permeabilidad de la membrana y disminuye la eficiencia de la reparación por escisión.

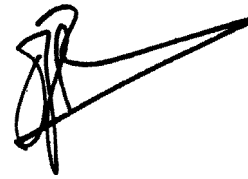
Los procesos alterados por la osmolalidad del medio, salvo la escisión, tienen un cierto grado de relación con la membrana citoplasmática. Por lo tanto, su modificación podría ser consecuencia de los cambios que produce el medio en la envoltura de esta cepa.

Los resultados presentados sugieren que una explicación similar podría aplicarse a las alteraciones detectadas en la reparación por escisión.

La confirmación de la existencia de una relación entre la reparación y la membrana, y el estudio de la naturaleza de esa posible relación, merecen una exploración más amplia. La cepa DA82 se presenta como un modelo promisorio para ese propósito.

Esta cepa contiene, además de la mutación bac - que le confiere osmosensibilidad, otras que afectan la regulación de la

síntesis de histidina. Recientemente D.N. Antón ha construido, por transducción mediada por el fago P1, varios pares de cepas que difieren solo en el alelo bac-. Estas cepas muestran también el comportamiento osmótico característico de DA82, y resultan aún más adecuadas para la realización del estudio propuesto.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Referencias Bibliográficas

- 1.-Antón, D.N., J.Bacteriology, 109:1273, 1972
- 1a.-Salton, M.R.J. "The Bacterial Cell Wall", Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964 .
- 2.-Rogers, H.J. y Perkins, H.R. "Cell Walls and Membranes", E.& F.N. Spon Ltd., Londres, 1968.
- 3.-Cronan, J.E. Jr. y P.R. Vagelos, Biochim. et Biophys. Acta, 265: 25, 1972 .
- 4.-Osborn, M.J. , J.E. Gander, E. Parisi, y J. Carson, J. Biol. Chemistry, 247:3962, 1972 .
- 5.-Esfanani, M., Rudkin, B.B., Cutler C.J., y Waldron P.I. J. Biol. Chemistry, 252:3194, 1977 .
- 6.-Filip, C., G.Fletcher, J.L. Wulff, y C.F. Earhart , J. Bacteriology, 115:717, 1973 .
- 7.-Ferro-Luzzi Ames, G., J. Biol. Chemistry, 249:634, 1974.
- 8.-Schnaitman, C.A., J. Bacteriology, 104:882, 1970 .
- 9.-Schnaitman, C.A., J. Bacteriology, 104:890, 1970 .
- 10.-Spratt, B.G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:2999, 1975 .
- 11.-Osborn, M.J., J.E.Gander, y E. Parisi, J. Biol. Chemistry, 247:3973, 1972 .
- 12.-Osborn, M.J., "Structure and Function of Biological Membranes" L.I. Rothfield, Ed., 343-400, Academic Press, N.Y., 1971
- 13.-Jones, R.W. y P.R. Garland, Biochem. J., 164:199, 1977 .
- 14.-Oxender, D.L., "Methabolic Transport", p.135-143, Academic Press, New York, 1972 .
- 15.-Cussler, E.L., D.F. Evans, y M.A. Matesich, Science, 172:377, 1971 .
- 16.-Epstein, W., y Schultz S.G., J.Gen. Phisiol. 49:221, 1965 .
- 17.-White, D.A., W.J. Lennarz, y C.A. Schnaitman, J. Bacteriology 109:686, 1972 .
- 18.-Bell, R.M., R.D. Mavis, M.J. Osborn, y P.R. Vagelos, Biochim. et Biophys. Acta, 249: 628, 1971 .
- 19.-White, D.A., F.R. Albright, W.J. Lennarz, y C.A. Schnaitman, Biochim. et Biophys. Acta, 249:636, 1971 .
- 20.-Osborn, M.J., Annu.Rev. Biochem. 38:501, 1969 .
- 21.-Rothfield, L. y A. Finkestein, Annu. Rev. Biochem. 37:463, 1968
- 22.-Rogers, H.J., Bacteriol. Rev., 34:194, 1970 .

- 23.-Costerton, J.W., J.M. Ingram, y K.J. Cheng, *Bacteriol. Rev.* 38:87, 1974 .
- 24.-Bayer, M.E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 235:6, 1974 .
- 25.-Salton, M.R.J., *Annu. Rev. Microbiol.* 21:417, 1967 .
- 26.-Rogers, H.J., *Ann. N.Y. Acad.Sci.*,235:29, 1974 .
- 27.-Braun, V., V. Bosch, K. Hantke, y K. Schaller, *Ann. N.Y.Acad. Sci.*,235:66, 1974 .
- 28.-Orce, L.V., comunicación personal .
- 29.-Weidel,W.,y Pelzer, H., *Advan. Enzymol.*,26:193, 1964 .
- 30.-Braun, V., K. Rehn, y H. Wolff, *Biochemistry*, 9:5041,1970.
- 31.-Braun, V., y Rehn, V., *Eur.J. Biochem.* 10:426, 1969 .
- 32.-Braun, V., y Sieglin,U., *Eur. J. Biochem.* 13:336, 1970 .
- 33.-Braun, V., y Wolff, H., *Eur. J. Biochem.* 14:387, 1970 .
- 34.-Inouye, M., J. Shaw, y C. Shen, *J. Biol. Chem.*,247:8154, 1972
- 35.-Wite, D., M. Dworkin, y D.J. Tipper, *J. Bacteriol*, 95:2186, 1968 .
- 36.-Forsberg, C.W., M.K. Rayman, J.W. Costerton, y R.A. MacLeod. *J. Bacteriol.* 109:895, 1972 .
- 37.-Glavert, A.M.,y M.J. Thornley, *Annu.Rev. Microbiol.* 23:159, 1969.
- 38.-Schnaitman, C.A., *J. Bacteriol.*,108:553, 1971 .
- 39.-Bayer, M.E., *J. Virol.*, 2:346, 1968 .
- 40.-Bayer, M.E., y C.C. Remsem, *J. Gen. Microbiol.*,53:395,1968 .
- 41.-Osborn, M.J., P.D. Rick, V. Lehmann, E. Rupprecht, y M.Singh *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 235: 52, 1974 .
- 42.-Inouye, M., A. Hirashima, and N. Lee, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 235:83, 1974 .
- 43.-Ferro-Luzzi Ames, G., E. Negri Spudich y H. Nikaido, *J.Bacteriol.*,117:406, 1974 .
- 44.-Lugtenberg, B., J. Meijers, R. Peters, P. Van der Hoek, y L. Van Alphen, *FEBS Letters*, 58:254, 1975 .
- 45.-Edstrom, R.D.,y E.C. Heat, *J.Biol.Chem.*,242:4125, 1967 .
- 46.-Leive, L., *Ann.N.Y.Acad.Sci.*,235:109, 1974 .
- 47.-Shingh, A.P., K.J. Cheng, J.W. Costerton, E.S.Idziad, y J. M. Ingram, *Canad.J.Microbiol.*18:909, 1972 .
- 48.-Payne, J.W., y C. Gilvang, *J. Biol.Chem.*,243:6291, 1968 .
- 49.-Decad, G.M., y Nikaido, H., *J. Bacteriol.* 128:325, 1976 .

- 50.-Nakae, T., J.Biol.Chem.,251:2176, 1976 .
- 51.-Nikaido, H., S.A. Song, L. Shaltiel, y M. Nurminen, Biochem. Biophys. Res. Comm.,76:324, 1977 .
- 52.-Sasaki,T., J. Bacteriol., 109:169, 1972.
- 53.-Tamaki, S.,T. Sato, y M. Matsushashi, J.Bacteriol. 105:968, 1971
- 54.-Van Alphen, L., B. Lugtenberg, R. Van Boxtel, y K. Verhoef, Biochim. et Biophys. Acta, 466: 257, 1977
- 55.-Mangiarotti, G., D. Apirion, y D. Schlessinger, Science 153: 892, 1966 .
- 56.-Lopes, J., S. Gottfried, y L. Rothfield, J. Bacteriol., 109: 520, 1972
- 57.-Lindsay, S. Shelang, B. Wheeler, K.E. Sanderson, y J. W. Costerton, Can. J. Microbiol.,19:335, 1973
- 58.-Heppel, L.A., Science,156:1451, 1967 .
- 59.-Ingram, J.M., K.J.Cheng, y J.W.Costerton, Can.J. Microbiol., 19:1407, 1973
- 60.-Nakane, P.K., G.E. Nichoalds, y D.L. Oxender, Science, 161, 182, 1968 .
- 61.-Pardee, A.B.,y K. Watanabe, J. Bacteriol. 96:1049, 1968 .
- 62.-De Voe, I.W., J. Thompson, J.W. Costerton, y R.A. McLeod , J. Bacteriol.,101:1014, 1970 .
- 63.-Grossman, L., "Advances in Radiation Biology", 4:77, 1974 .
- 64.-Witkin, E.M. , Annu.Rev. Microbiol., 23:487, 1969 .
- 65.-Howard-Flanders, P., Annu. Rev. Biochem. 37:175, 1968 .
- 66.-Koller, R.L., "Ultraviolet Radiation", John Wiley & Sons , New York , 1965 .
- 67.-Jagger, J., "Introduction to research in Ultraviolet Photobiology, Prentice Hall Inc. New Jersey , 1967 .
- 68.-Jagger, J., Bacteriol. Rev. 22:99, 1958 .
- 69.-Rahn, R.O., "Introduction to Radiation Biology", Academic Press, New York, 1971 .
- 70.-Setlow, R.B., Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology 8: 257, 1968
- 71.-Mc Laren, A.D., y Shugar D., "Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids", Pergamon Press, N.Y., 1964 .
- 72.-Rupert, C.S., y Goodgal, S.H., Nature,185:556, 1960 .
- 73.-Setlow, J.K., y Setlow, R.B., Nature, 197:560, 1963
- 73a.-Setlow, J.K., M.L. Randolp, M.E. Boling, A. Mattingly, G.

- Price, y M.P.Gordon , Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXIII, 209, 1968 .
- 74.-Dertinger, H., Jung, H., "Molecular Radiation Biology" Heidelberg Science Library, 1968 .
- 75.-Grossman, L., A.Braun, B. Garvik, L. Hamilton, y I.Mahler, Proc. Internatl. Symp. on "New Trends In Photobiology", Rio de Janeiro , 1973 .
- 76.-Zimmer, K.E., y Müller, A. "Current topics in Radiation Research" , North-Holland Publ. Co., Amsterdam , 1965 .
- 77.-Müller, A., Progr. Biophys.,17:99, 1967
- 78.-Scholes, G., J.F. Ward, J.J.Weiss, J. Mol. Biol.2:379, 1960
- 79.-Scholes, G., J.J. Weiss, J. Expl. Cell Res.,2:219, 1952 .
- 80.-McGrath, R.A., y R.W. Williams, Nature,212:534 , 1969 .
- 81.-Witkin, E.M., Bacteriol. Rev.,40:869, 1976 .
- 82.-Rupert, C.S., y Harm, W. "Advances in Radiation Biology" Academic Press, New York, 1966 .
- 83.-Wulff, D.L., y Rupert, C.S., Biochem.Biophys. Res. Comun.7: 237, 1962 .
- 84.-Jagger, J., "Radiation Protection and Recovery", Pergamon Press, Long Island, N.Y., 1960 .
- 85.-Rupert, C.S., Photochem.,Photobiol., 4:271, 1965 .
- 86.-Harm, W., H. Harm, y C.S. Rupert, Mutation Research,6:371,1966
- 87.-Setlow, R.B., y Carrier, W.L., Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 49:226, 1963 .
- 88.-Braun, A, y L. Grossman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:1838, 1974 .
- 89.-Grossman, L., J.C. Kaplan, S.R. Kushner, y I. Mahler. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXIII, 229 , 1968 .
- 90.-Cleaver, J.E., Advances in Radiation Biology, 4:1,1974 .
- 91.-Kaplan, J.C., Kushner, S.R., y Grossman L. , Biochemistry, 10:3315, 1971 .
- 92.-Kanner, L., y P. Hanawalt, Biochem.Biophys. Res. Comun.,39: 149, 1970 .
- 93.-Town C.D., K.C. Smith, y H.S. Kaplan, Science 172:851,1971 .
- 94.-Masker, W.E., y P.C. Hanawalt, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70:129, 1973 .
- 95.-Boyle, J.M., M.C. Paterson, y R.B. Setlow , Nature, 226:708, 1970.

- 96.-Glickman, B.W., *Biochim. et Biophys. Acta*, 335:115, 1974 .
- 97.-Wacker, A., H. Dellweg, y D. Weinblum D., *Naturwissenschaften*,
47:477, 1960 .
- 98.-Günter, H.L. y Prusoff, W.H. *Methods in Enzymology*, 12a:19,
19
- 99.-Youngs, D.A., y K.C. Smith, *Nature New Biology*, 244, 240, 1977
- 100.-Cozzarelli, N.R., N.E. Melechen, J.M. Tovin, y A. Kornberg,
Biochem. Biophys. Res. Comun., 28:578, 1967 .
- 101.-Gellert, M., J., Little, C.K. Oshinsky, y S.B. Zimmerman,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXIII:21, 1968 .
- 102.-Olivera, B.M., Z.W. Hall, Y. Anaku, J.R. Chien, y I.R. Lehman.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXIII:27, 1968 .
- 103.-Youngs D.A., y Smith K.C., *Molec. Gen. Genet.*, 152:37, 1977 .
- 104.-Lehman, I.R., *Science*, 186:790, 1974 .
- 105.-Okazaki, R., T. Okazaki, K. Sakabe, K. Sugimoto, A. Sugino,
y N. Inatsuki . *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* XXXIII:
129, 1968 .
- 106.-Pauling, C. y Humm L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 60:1495,
1968 .
- 107.-Dean, C., y C. Pauling, J. *Bacteriol.* 102:588, 1970 .
- 108.-Town, C.D., K.C. Smith, y H.S. Kaplan, *Radiat. Res.* 52:99, 1972
- 109.-Town, C.D., K.C. Smith, y H.S. Kaplan, *Radiat. Res.* 55:334, 1973
- 110.-Hariharan, P.V. y Cerutti P.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,
71: 3532, 1974 .
- 111.-Town, C.D , K.C. Smith, y H.S. Kaplan, *Science*, 172:851, 1971.
- 112.-Harm, W., *Photochemistry and Photobiology*, 5:747, 1966.
- 113.-Howard-Flanders, P., W.D. Rupp, B.W. Wilkins, y R.S. Cole ,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXXIII:195, 1968 .
- 114.-Rupp, W.D., y Howard-Flanders P., *J. Mol. Biol.*, 31:291, 1968.
- 115.-Ganesan, A.K., *J. Mol. Biol.*, 87:103, 1974 .
- 116.-Ganesan, A.K., y Smith, K.C., *J. Bacteriol.*, 111:575, 1972 .
- 117.-Witkin, E.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71:1930, 1974
- 118.-George D.L., y Witkin, E.M., *Molec. Gen. Genet.*, 135:283, 1974.
- 119.-Alpert T., *Nature*, 217:862, 1968 .
- 120.-Hewitt, H.B. y J. Read , *British J. Radiol.* 23:416, 1950
- 121.-Alpert, T., *British J. Radiol.* 27:50, 1954 .
- 122.-Bacq , Z.M., y P. Alexander, "Fundamentals of Radiobiology"
Pergamon Press, Oxford, 1961 .

- 123.-Alpert, T. , Phys. Med. Biol., 8:365, 1963 .
- 124.-Alpert. T. , Proc. XVIIIth. Ann. Symp. Fundamental Cancer Research. The Williams and Wilkins Co.Baltimore, 1965 .
- 125.-Shalek, R.I., y Gillespie, T.L."Radiation Biology and Cancer"
Peter Owen Ltd. , 1960 .
- 126.-Alper, T. y Haig, D.A., J. Gen. Virol. 3:157,1968 .
- 127.-Watkins, D.K. , Adv.Biol.Med. Physics, 14:256, 1970 .
- 128.-Yatvin, M.B., P.G. Wood, y S.M. Brown, Biochim. et Biophys.
Acta, 287:390, 1972 .
- 129.-Yatvin, M.B., Int.J. Radiat.Biol.,30:571, 1976 .
- 130.-Jacob, F., A.Ryter, F. Cuzin, Proc. R.Soc.London,164:267,1966.
- 131.-Cramp, W.A., D.K. Watkins, y J. Collins, Int. J. Radiat.
Biol.,22:379, 1972 .
- 132.-Cramp, W.A. y Petrusek, R., Int. J. Radiat. Biol.26:277,1974 .
- 133.-Cramp, W.A. y Walker, A., Int.J.Radiat. Biol.25:175,1974.
- 134.-Burrell, A.D. , P. Feldshreiber, y J.Dean , Biochim et
Biophys. Acta, 247:38,1971 .
- 135.-Westling-Haggström , B., y S. Normark , J.Bacteriol.,12375,
1975 .
- 136.-Antón D.N., comunicación personal .
- 137.-Knipers, J., Nature 226:718, 1970
- 138.-Sanderson, K.E., Bacteriol Rev., 36:558,1972
- 139.-Sanderson, K.E., Bacteriol Rev., 40: ,1976
- 140.-Antón D.N., comunicación personal .
- 141.-Antón D.N., Departamento de Radiobiología, C.N.E.A., infor-
me de actividades 1975-1976 , CNEA NT/1/77 .
- 142.-Adams, M.H. "Bacteriophages", Interscience Publ. Inc.N.York
1959 .
- 143.-Antón D.N., y Quintans, C.J. , Departamento de Radiobiología
C.N.E.A., informe de actividades 1975-1976, CNEA NT/1/77.
- 144.-Smith, H.S., y L.I. Pizer, J. Mol. Biol. 27:131,1968 .
- 145.-Silver, S., y L. Wendt, J. Bacteriol.,93:560,1967 .
- 146.-Quintans, C.J., Departamento de Radiobiología, C.N.E.A.,
informe de actividades 1975-1976 , CNEA NT/1/77 .
- 147.-Umbreit, W.W., Burris, R.H., y Stauffer. "Manometric tecni-
ques", Burgess Pub. Co. Minneapolis, 1945 .
- 148.-Cohen, G.N. y J. Monod, Bacteriol. Rev. 21:169, 1957 .
- 149.-Britten, R.J., y F.T. McClure, Bacteriol. Rev.,26:292, 1962.

- 150.-Piperno, J.R., y D.L.Oxender, J.Biol.Chem.,241:5732, 1966 .
- 151.-Penrose, W.R., G.E. Nichoalds, J.R. Piperno, y D.L.Oxender, J.Biol.Chem.,243:5291, 1968 .
- 152.-Penrose, W.R., R. Zand, y D.L. Oxender, J.Biol.Chem. 245: 1432, 1970 .
- 153.-Piperno, J.R., y D.L. Oxender, J. Biol.Chem., 243:5914,1968 .
- 154.-Weibull,C., W.D. Bickel, W.T. Haskins, K.C. Milner, y E. Ribi, J.Bacteriol., 93:1143, 1967.
- 155.-Singer, T.P., y Kearney, E.B., Methods in Biochem. Analysis, 4:36, 1957 .
- 156.-Arrigoni O. y Singer, T., Nature 193:1256, 1962 .
- 157.-Osborn, M.J., y Munson , R., Methods in Enzymology, ,642 197 .
- 158.-Reid, M.S. y Bielecki R.L., Anal. Biochem. 22:374, 1968 .
- 159.-Quintans C.J., Resultados no publicados .
- 160.-Goulian , M., Ann.Rev.Biochem. 40:855,1971 .
- 161.-Lark, K.G., Ann.Rev.Biochem. 38:569,1969 .
- 162.-Sedliaková, M., E. Stenfunková, y N. Bertánová, J. Bacteriol. 107: 16.1971 .
- 163.-Rowbury, R.J., Int. J. Radiat. Biol. 21:297.1972 .
- 164.-Prevost, C. y V. Moses, J. Bacteriol.,91:1446, 1966 .
- 165.-Davies, R., A.J.Sinsky, y D. Botstein., J.Bacteriol., 114: 357,1973 .
- 166.-Chargaff, E., y J.N. Davidson , "The nucleic acids, chemistry and biology" Vol I . Academic Press, New York, 1955 .
- 167.-Setlow, R.B. , Photochem. Photobiol. 3:405, 1966 .
- 168.-Setlow, R.B. , "Mammalian cytogenetics and related problems in radiobiology". Pergamon Press, Long Island N.Y. 1964 .
- 169.-Vogel, H.J. y D.M. Bonner, J. Biol. Chem., 218:97, 1956 .
- 170.-Wulff, D.L., J. Molec.Biol., 7:431,1963 .
- 171.-Youngs, D.A. y K.C. Smith , Nature New Biology, 244:240,1973.
- 172.-Seeberg, E. y P. Strike, J. Bacteriol. 125:787,1976 .
- 173.-Fraser, D.H., R. Mahler, A.L. Shug, y C.A. Thomas , Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,43:939,1957 .
- 174.-McGrath R.A. y R.W. Williams, Nature, 29:534, 1966 .
- 175.-Britten,R.J. y F.T. McClure, Bacteriol.Rev.,26:292,1962 .
- 176.-Mitchell, P. y Hoyle, J., J. Gen. Microbiol,10:533, 1954 .
- 177.-Leive, L. "Membranes and Walls of Bacteria", Marcel Dekker, New York, 1973.-

- 178.-Raué, H.A. y M. Cashel, Biochim. et Biophys. Acta, 312:
722,1973 .
- 179.-Raué, H. A. y Cashel, M., Biochim. et Biophys. Acta ,
340:40, 1974 .
- 180.-Maaloe, O., y Kjeldgaard , N.O., "Control of macromolecular
synthesis" W.A. Benjamin, New York , 1966 .
- 181.-Van Der Schueren, E., K.C. Smith, y H.S. Kaplan, Radiat.
Res. 55:346,1973 .
- 182.-Quintans C.J., resultados no publicados .
- 183.-Maurel, P., P. Douzou, J. Mol.Biol. 102:253 1976.
- 184.-Douzou, P. y P.Maurel, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 74:1013,
1977 .
- 185.-Billen, D. y Bruns , L., J. Bacteriol.,103:400,1970 .
- 186.-Hanawalt, P.C., Photochem. Photobiol. 5:1,1966 .
- 187.-Nair, C.K.K. , D.S. Pradhan, y A Sreenivasan
J. Bacteriol. 121:392, 1975 .