

204
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**INDUCCION POR RADIACION GAMA DE LAS FUNCIONES
SOS EN CEPAS DE E. COLI CON DIFERENTES
CAPACIDADES DE REPARACION**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.

RADIACION.

- Radiación electromagnética.
- Radiación corpuscular.
- Dosimetría.
- Unidades de dosis.
- La radiación en sistemas biológicos.

ADN.

DAÑOS A LA MOLECULA DE ADN.

- Lesiones al DNA provocadas por radiación ionizante.
- Lesiones provocadas por luz UV.

MECANISMOS DE REPARACION.

- Mecanismos específicos.
- Mecanismos no específicos.
- Reparación por recombinación.

SISTEMAS DE TOLERANCIA Y REPARACION INDUCIBLES POR DAÑO GENETICO.

- Respuesta al stress oxidativo.
- Respuesta al choque térmico.
- Respuesta SOS.

MATERIAL Y METODO.

RESULTADOS.

DISCUSION.

CONCLUSIONES.

APENDICE .

REFERENCIAS.

RESUMEN

El sistema SOS de *Escherichia coli* está formado por varios genes implicados en mecanismos de reparación y/o tolerancia que solamente se activan como respuesta al daño en el genoma bacteriano. la inducción de estas funciones puede cuantificarse gracias a la técnica del cromosensado, desarrollada por Quillardet y Hofnung en 1985.

Utilizando esta prueba como indicador de daño genético se observó que en *E. coli* la respuesta a la radiación gama difiere en función de la razón de dosis. Lo anterior sugería la acción de un mecanismo de reparación que se activaba con dosis bajas de radiación. Los resultados obtenidos a partir de cepas deficientes en diversos mecanismos de reparación construidas en este laboratorio apoyan esa suposición. Se comprobó además que en los mutantes más sensibles 1 Gy de radiación gama es suficiente para inducir las funciones SOS de dichas cepas al doble de la tasa basal.

RADIACION

En el año de 1896 el físico Henry Becquerel, estudiando la fluorescencia que presentaban ciertas sales de uranio ($K_2U_2O_7$ [SO_4] $_2 \cdot 2H_2O$) al exponerlas a los rayos solares, hizo accidentalmente un descubrimiento sorprendente. En sus primeros experimentos había observado que los cristales de uranio después de exponerse a la luz solar ennegrecían una placa fotográfica, cualquiera que fuese su intensidad lumínica. En una ocasión guardó una pequeña cantidad de muestra de las sales (sin exponerlas previamente a la luz) en un cajón cerrado sobre una placa fotográfica, para utilizarla posteriormente. Al revelar días después la placa se encontró con que esta se había ennegrecido por completo exactamente en el sitio sobre el cual se encontraba la muestra. Probó entonces otras sustancias que contenían uranio e incluso lo que se pensaba era uranio metálico, obteniendo en todas sus pruebas una respuesta proporcional a la cantidad de uranio en cada sustancia.

En 1898, Pierre y Marie Sklodowska Curie, al reunir todos los resultados de experimentos tanto de Becquerel como de otros investigadores, concluyeron que los rayos de uranio eran un fenómeno atómico característico del elemento, sin importar su estado físico y/o químico, dando a este fenómeno el nombre de radioactividad. Los esposos Curie lograron aislar otros elementos radioactivos como el polonio y el radio y detectaron también la radioactividad del torio. Actualmente se sabe que todos los elementos con número atómico mayor de 83 son radioactivos (Bueche, 1970).

La radiación se da por la desintegración de átomos inestables; es importante debido a que la energía que posee es capaz de provocar cambios en las moléculas de la materia a través de la cual viaja. La radiación ionizante provoca la salida de electrones orbitales de los átomos del material que atraviesa, dando lugar a iones que pueden afectar de distintas maneras a biomoléculas importantes, como lo es el ADN.

La radiación ionizante puede dividirse en dos categorías: la electromagnética (rayos X y gama) y la corpuscular (partículas alfa, beta, protones, neutrones y fragmentos de fisión); la primera categoría posee sólo energía, mientras que la segunda posee energía y masa. Esto es importante debido a la diferente penetración que presentan al incidir en un material y en la manera en que éste absorbe la energía.

Radiación Electromagnética (rayos X y gama)

Presentan longitudes de onda de 10^{-11} a 10^{-7} cm (10^{-2} a 10^2 nm). La longitud de onda es inversamente proporcional a la energía del fotón, teniendo así mayor energía los rayos con menor longitud de onda (Fig. 1). Las radiaciones gama se producen en el núcleo atómico, cuando éste libera energía para ganar estabilidad, mientras que los rayos X se producen artificialmente cuando las partículas cargadas inciden sobre un blanco apropiado.

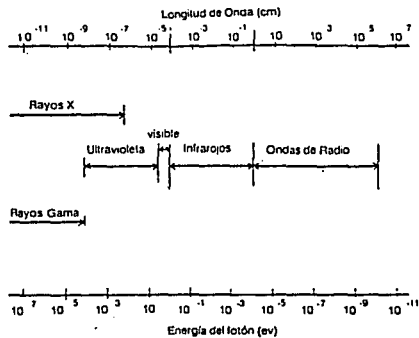


FIG.1.-LONGITUD DE ONDA Y ENERGIA DE LA RADIACION ELECTROMAGNETICA (CASARETTI, 1968).

La radiación electromagnética puede afectar al material por el que pasa de tres maneras distintas que se conocen como: efecto fotoeléctrico, efecto Compton y producción de pares. En el primer caso toda la energía del rayo va a ser transferida a un electrón, sacándolo de su órbita. En el segundo el fotón transfiere sólo parte de su energía expulsando un electrón y desviándose de su trayectoria original, a la vez que aumenta su longitud de onda. Los fotones de más alta energía siguen por lo general el mecanismo de producción de pares; en este caso un rayo gama que pasa cerca de un núcleo desaparece, expulsando un positrón y un electrón (Fig. 2).

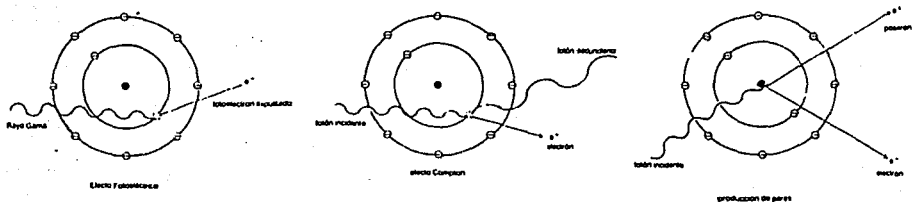


FIG.2.-IONIZACION DEL MATERIAL POR RADIACION ELECTROMAGNETICA (CASARETTI, 1968).

Radiación corpuscular (partículas α y β)

Debido a que este tipo de radiaciones posee masa, su penetración es muy reducida en comparación con la de las radiaciones electromagnéticas, sin embargo tienen un gran poder de ionización al interactuar con la materia.

Las partículas α son núcleos de helio constituidos por dos protones y dos neutrones, lo que les confiere una doble carga positiva (2^+). Gracias a esta carga presentan una marcada atracción electrostática hacia los electrones exteriores de los átomos a los que se acercan, provocando que estos se exciten y cambien de orbital o bien que sean expulsados (el electrón expulsado y el átomo positivo resultante forman lo que se conoce comúnmente como par de iones). Conforme viaja la partícula α va perdiendo velocidad, lo que aumenta su poder de ionización, ya que va cediendo cada vez mayor cantidad de energía a la materia, hasta descargarse por completo (Fig. 3). Al hacerlo la partícula α captura dos electrones, formando así un átomo de helio.

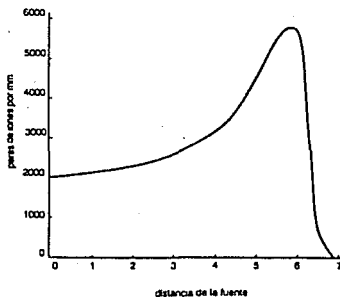


FIG.3.-CURVA DE BRAGG (CASARETT, 1968).

Las radiaciones β son en realidad electrones provenientes del núcleo y según sea su carga positiva o negativa se denominan positrones ó negatrones, respectivamente. Dado que las partículas β tienen sólo $1/7400$ de la masa de las partículas α y son emitidas a una velocidad igual a la de la luz, es difícil que interactúen con los electrones orbitales de los átomos a los que se aproximen, por lo que su penetración en la materia es mayor. Se ha calculado que en cada impacto de una partícula β con electrones orbitales ocurre una ionización por cada 32.5 eV de energía transferida. Cuando el negatrón pierde toda su energía, se incorpora a un átomo positivo como electrón orbital, mientras que el positrón interactúa con un electrón orbital, eliminándose mutuamente (Casarett, 1968; Arena, 1971).

Dosimetría

Como ya se ha mencionado la importancia de la radiación radica en la energía que conlleva. La dosis es la cantidad de energía depositada en o absorbida por un material al paso de la radiación.

La cantidad de radiación que llega a un objeto se conoce como dosis de exposición; algo de la energía de la exposición se disipa dentro del objeto, siendo ésta la dosis absorbida. Al pasar por el material, la radiación deposita sólo una parte de su energía y la restante, ó residual, se conoce como dosis transmitida. Así la dosis original a la cual fue expuesto el objeto se descompone en diferentes fracciones (Fig.4).

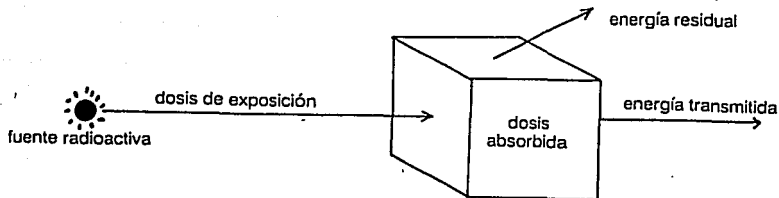


FIG.4.-FRACCIONES EN LAS QUE SE DESCOMPONE LA DOSIS DE EXPOSICION AL PASAR POR UN MATERIAL (CASARETT, 1968).

La dosis de exposición depende de varios factores físicos como son la actividad de la fuente radioactiva y su energía de decaimiento, la distancia entre la fuente y el objeto, el tiempo de exposición o bien de la presencia de diversos absorbedores entre la fuente y el material, como aire, agua, etc.

Al irradiar sistemas biológicos la fracción de la dosis de exposición que interesa es la absorbida, ya que esta energía es la responsable de los efectos dañinos en los seres vivos. Un factor muy importante es la razón de dosis, es decir, el tiempo que se requiere para dar una cierta cantidad de radiación. Se ha visto que la respuesta de un organismo a una misma dosis de radiación ionizante varía según el tiempo que tarda en aplicarse (Arena,1971; Grosch y Hopwood,1979).

Unidades de dosis

Roentgen.-El roentgen (R) es una unidad de dosis de exposición, referida a la cantidad de iones producidos en aire por la

radiación electromagnética. Se define como la exposición a rayos X ó gama que va a producir una unidad electrostática de electricidad de cualquier signo en un cm de aire seco, en condiciones normales (20°C, 76 mmHg). Expresada en ergios esta energía es de aproximadamente 87.6. El roentgen sólo se utiliza para la radiación electromagnética.

Rad.- En sistemas biológicos tiene primordial importancia la cantidad de energía absorbida por el material (tejido blando, hueso, bacterias, etc) sobre el cual incidió la radiación. Considerando esto, la Comisión Internacional de Unidades Radiológicas (ICRU) propuso en 1954 el rad (radiation absorbed dose). Está definido como 100 ergios de energía disipados en 1 g del material irradiado, sin importar el tipo de radiación.

Gray.- Representa la absorción en un kg de material de 1 joule de energía. 1 gray (Gy) equivale a 100 rads.

Rem.- Esta es una unidad de equivalencia, dado que una misma dosis de rads tiene distintos efectos biológicos según el tipo de radiación que se aplique. Para propósitos de protección radiológica se toma como la dosis absorbida en rads multiplicada por el LET y por el factor de calidad, específico para cada tipo de radiación.

LET.- Transferencia lineal de energía. Se refiere al promedio de energía perdida por la radiación en 10^3 nm.

Curie.- Esta en realidad es una medida de actividad que indica la tasa de decaimiento de un elemento radioactivo. Su valor es de 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo (Wang y Willis, 1965; Casarett, 1968; Arena, 1971).

La Radiación en Sistemas Biológicos.

Al incidir la radiación ionizante sobre las células puede afectar tanto a sus componentes estructurales como al ADN. Los daños a los primeros son en general temporales mientras que en el ADN pueden ser temporales o permanentes. Si las células forman parte de tejidos somáticos, los daños al material genético afectan solamente al individuo, pero si pertenecen a tejidos germinales, los daños pueden propagarse a la descendencia, teniendo en ocasiones consecuencias muy graves dentro de la población. Los daños de la radiación sobre el ADN pueden dar lugar a tres eventos finales: recuperación total, mutaciones diversas o muerte celular (Fig. 5).

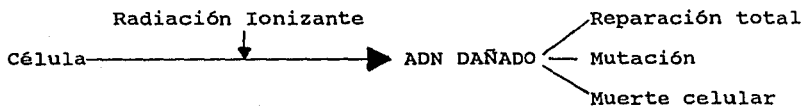


FIG. 5.

El efecto de la radiación sobre el organismo puede ser directo ó indirecto. El primero se refiere al daño que provoque la radiación al incidir directamente sobre la materia viva, mientras que el segundo es causado por los productos de la radiólisis del agua, principalmente iones (H^+ , OH^- , HO_2), y/o peróxidos (principalmente H_2O_2) al interactuar con el ADN o con cualquier otro tipo de molécula importante (Wang y Willis, 1965; Casarett, 1968; Arena, 1971; Grosch y Hopwood, 1979).

ADN

El ADN es una molécula muy importante en los seres vivos, ya que en ella se almacena la información genética que determina la estructura de todas las proteínas y permite la transmisión fidedigna de los caracteres de la especie de una generación a otra. Es una molécula catenaria de gran peso molecular formada por dos largas hebras unidas entre sí y presenta una estructura helicoidal que le confiere gran estabilidad. Cada hebra está formada por la unión de una enorme cantidad de monómeros conocidos como nucleótidos, los cuales están constituidos por una base nitrogenada, un azúcar (desoxirribosa) y una molécula de ácido fosfórico. En el ADN se encuentran cuatro tipos de nucleótidos, que se distinguen entre sí gracias a la base nitrogenada. La adenina y la guanina son bases derivadas de la purina y la timina y la citosina derivan de la pirimidina (Fig. 6).

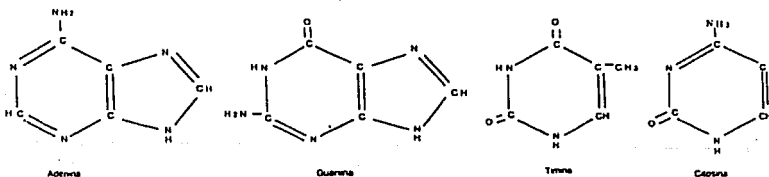


FIG. 6. -BASES
(LENNINGER, 1980).

NITROGENADAS

QUE

CONFORMAN

AL

ADN

Los anillos de desoxirribosa se encuentran unidos entre sí por medio de enlaces fosfodiéster con el ácido fosfórico, formando largas cadenas que constituyen el esqueleto del ADN,

mientras que las bases se unen al azúcar por enlaces N-glucosídicos y se encuentran como cadenas laterales orientadas hacia el interior de la molécula. Las bases de las dos cadenas se unen entre sí por puentes de hidrógeno, apareándose siempre del mismo modo: adenina con timina y guanina con citosina.

El código genético se da gracias a la sucesión de tripletes de estas bases a lo largo de una de las cadenas, lo que determina la secuencia de aminoácidos de la proteína para la cual codifica cada gen. El ADN contiene además la información necesaria para la transcripción selectiva de los genes, dada por la interacción de secuencias específicas y de proteínas que pueden actuar como represores ó promotores sobre el operador de cada gen, impidiendo o ayudando la transcripción, respectivamente (Goodenough y Levine, 1974; Lehninger, 1980; Alberts, 1989).

DAÑOS A LA MOLECULA DE ADN

El ADN está expuesto a una gran cantidad de elementos tanto físicos como químicos, que pueden alterar su estructura y función. Se ha observado que el calor puede provocar desaminación o pérdida de bases, la luz UV produce dímeros de pirimidinas, la radiación ionizante provoca la apertura de anillos en las bases y rupturas de una o de las dos hebras de la molécula, por no mencionar a la gran cantidad de agentes químicos que pueden actuar (como agentes alquilantes, por ejemplo) sobre el material genético.

Lesiones al ADN provocadas
por radiación ionizante

A pesar de que la radiación no actúa sobre sitios específicos en el DNA, las lesiones que produce pueden agruparse en tres clases: rupturas de una banda (RSB), rupturas de doble banda (RDB), y daños a las bases. En el primer caso se interrumpe la continuidad de una de las hebras de la doble hélice. La mayor parte de estos daños ocurre por efecto indirecto debido principalmente a los grupos OH, producto de la radiólisis. Estos radicales pueden reaccionar con cualquier carbono de la desoxirribosa, sustrayendo un átomo de hidrógeno para formar una molécula de agua (Fig. 7). Al degradarse o

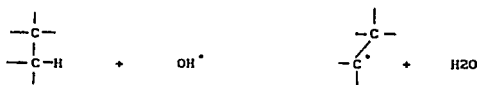


FIG. 7

alterarse el azúcar hay una ruptura en el enlace estérico 3' ya que el carbono queda cargado y es susceptible de reaccionar con otras moléculas. El enlace desoxirribosa-fosfato es también susceptible de reaccionar con los radicales libres o bien de romperse por efecto directo. En algunas ocasiones la radiación no conduce directamente a rupturas en la cadena sino que sensibiliza algunos sitios de modo que al aplicar un tratamiento alcalino se rompen. Este tipo de lesiones se conocen como alcalino-sensibles, y las más estudiadas son las conocidas como sitios AP (apurínicos o apirimidínicos) donde al romperse el enlace N-glucosídico se pierde la base

correspondiente (los sitios AP también se producen por la acción de enzimas de reparación).

El segundo tipo de daño (RDB) ocurre cuando simultáneamente se rompen sitios opuestos en ambas cadenas. Aún cuando es mucho menos frecuente que las rupturas de una sola banda, tiene una mayor relevancia en cuanto a la respuesta biológica. Anteriormente se pensaba que este tipo de lesiones era irreparable ya que no se cuenta con una hebra íntegra que sirva como molde para restituir a la doble hélice, sin embargo se ha comprobado que la reparación puede llevarse a cabo por mecanismos de recombinación. En radiaciones de bajo LET la frecuencia de las rupturas dobles con relación a las sencillas es de aproximadamente 5%, mientras que con radiaciones de alto LET la frecuencia es mucho mayor (Gentner y Paterson, 1984).

Uno de los daños más frecuentes al irradiar sistemas biológicos es el que se produce sobre las bases y se debe principalmente a la reacción entre los productos de la radiólisis y aquéllas. Se ha comprobado que, a pesar de que tanto purinas como pirimidinas son igualmente susceptibles a este ataque, principalmente el del radical OH, el daño a las primeras es menos frecuente y se da principalmente en ausencia de oxígeno. Los grupos OH atacan principalmente a los enlaces 5-6 de las pirimidinas mediante una reacción de adición (Fig. 8). En las purinas el daño principal se produce en el anillo de imidazol, el cual se abre y da lugar a un derivado de la pirimidina. Presentan siempre un compuesto intermediario de tipo carbinolamida (Fig. 9) (Friedberg, 1985)

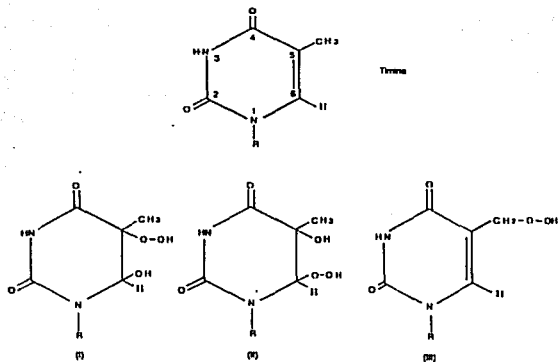


FIG. 8.-REACCION DE LOS PRODUCTOS DE LA RADIOLISIS SOBRE LAS PIRIMIDINAS (FRIEDBERG, 1985).

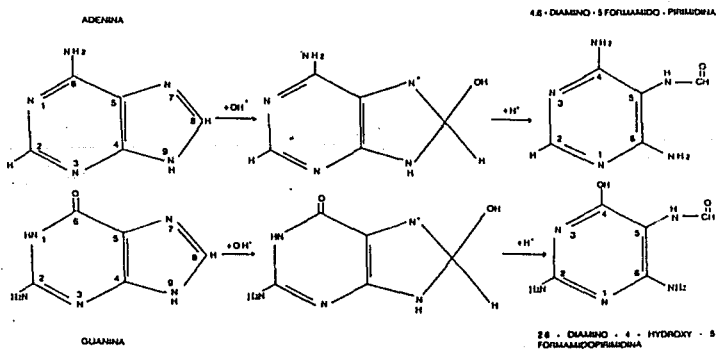


FIG. 9.-REACCION DE LOS PRODUCTOS DE LA RADIOLISIS SOBRE LAS PURINAS (FRIEDBERG, 1985).

Lesiones Provocadas Por Luz UV

El agente físico más comúnmente utilizado en el estudio de lesiones en el ADN es la luz ultravioleta (UV). El daño más frecuente producido por este tipo de luz es la formación de dímeros de pirimidina. Al ser expuesto el ADN a radiación de longitud de onda cercana a su pico máximo de absorción (260 nm), las pirimidinas que se encuentran juntas en la secuencia de una de las cadenas se unen covalentemente, formándose un anillo de ciclobutano como resultado de la saturación de los carbonos 5 y 6 de cada uno de los anillos pirimídicos (Fig. 10). Los dímeros de pirimidina son muy estables, incluso en condiciones extremas de pH y/o temperatura; sin embargo, la célula cuenta con mecanismos de reparación capaces de eliminarlos (Friedberg, 1985).

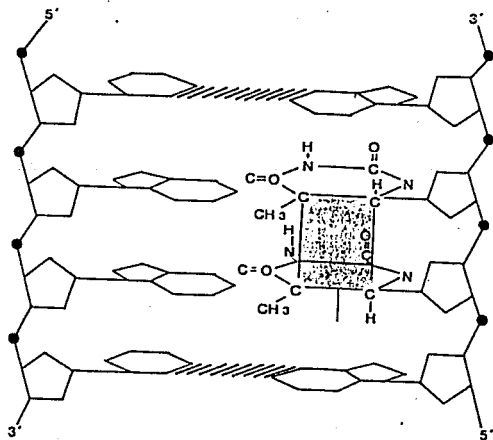


FIG.10.-ANILLO DE CICLOBUTANO (FRIEDBERG, 1985).

MECANISMOS DE REPARACION

Dada la relevancia del ADN en todos los organismos, es importante que estos cuenten con la posibilidad de reparar los daños que pudieran ocurrir en dicha molécula, conservando hasta donde sea posible la información genética intacta. Para ello cuentan con diversos procesos conocidos en conjunto como mecanismos de reparación (Sancar y Sancar, 1988). Ya que dentro de éstos existen tanto los que reconocen sólo ciertas lesiones muy particulares como otros que pueden intervenir en la reparación de diversos tipos de daño, es posible con fines prácticos agruparlos en dos categorías: mecanismos específicos y no específicos.

Mecanismos Específicos

Uno de los mecanismos más característicos y que es en sí el ejemplo clásico del primer grupo es la fotorreactivación, proceso llevado a cabo por una sola enzima, la ADN-fotoliasa. Esta enzima reconoce los dímeros de pirimidinas y se adhiere a ellos formándose un complejo enzima-sustrato. Al incidir luz de cierta longitud de onda sobre este complejo se lleva a cabo la reacción enzimática que rompe los enlaces covalentes del anillo de ciclobutano (ver Fig. 7), restaurándose la estructura original del ADN (Fig. 11) (Friedberg, 1985).

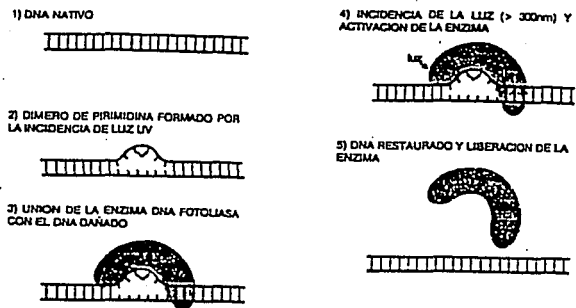


FIG.11.-ACCION DE LA ENZIMA DNA FOTOLIASA (FRIEDBERG, 1985).

Otro mecanismo específico es la reparación de la 0-6-alquilguanina. Este daño es consecuencia del tratamiento con agentes alquilantes como la metil-nitro-nitrosoguanidina (MNNG). La enzima encargada de reparar este tipo de lesiones es la 0-6-alquilguanina-alquil-transferasa, la cual reconoce como sustratos a la 0-6-metilguanina y a la 0-6-etilguanina (Friedberg, 1985).

Un mecanismo más de reversión de daño es la reparación de rupturas de una banda. Este tipo de lesiones es muy frecuente al tratar a las células con radiación ionizante, y el lo lleva a cabo la enzima ADN-ligasa reconstituyendo directamente el enlace fosfodiéster (Friedberg, 1985).

Mecanismos No Específicos

Este tipo de mecanismos puede participar en la reparación de una gran diversidad de lesiones. Dentro de esta categoría los más característicos son los de reparación por escisión. Estos sistemas, a pesar de presentar diferencias en cuanto a reconocimiento del tipo de daño, se ajustan todos a un patrón característico de eventos que son: reconocimiento del daño, corte y degradación subsecuente de la cadena de ADN y finalmente, reconstitución del tramo perdido.

La reparación por escisión puede seguir dos vías distintas dependiendo del daño que exista en el ADN. Si se trata de bases dañadas o equivocadas (por la inserción de alguna base inapropiada como el uracilo, por ejemplo) se lleva a cabo el mecanismo conocido como reparación por escisión de bases. En este caso están involucradas en forma secuencial una ADN-glucosidasa y una endonucleasa AP. Al detectar una lesión, la ADN-glucosidasa rompe el enlace N-glucosídico que une a la ribosa con la base dañada, dando lugar a un sitio AP por la eliminación de ésta. Este sitio es a su vez reconocido por la endonucleasa AP, que hace un corte en el enlace fosfodiéster (ya sea en 3' ó en 5'). En este punto se pueden seguir dos caminos: la acción de otra endonucleasa que corte en el extremo opuesto de la ribosa dejando un hueco de un solo nucleótido en la cadena o bien la función de una exonucleasa, la cual reconoce como sustrato los cortes de una banda y degrada el ADN (ya sea en dirección 5'-3' ó 3'-5'), liberándose entonces un oligonucleótido (Fig.12) (Lindahl,1982).

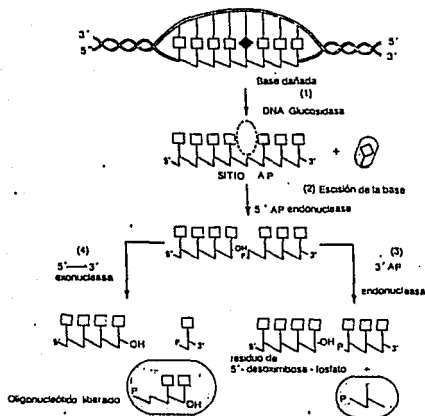


FIG. 12.-CAMINOS QUE PUEDE SEGUIR LA REPARACION POR ESCISION (FRIEDBERG, 1985).

La célula cuenta con gran cantidad de ADN-glucosidasas específicas para diferentes tipos de daño. Hay dos glucosidasas de gran importancia ya que intervienen en la reparación de lesiones provocadas por radiación ionizante, como es el caso de la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-N-metil formamidopirimidina, que es un producto de la degradación de las purinas.

A pesar de la gran cantidad de ADN-glucosidasas, hay muchos otros tipos de daños en el genoma que éstas no reconocen. Para reparar esas lesiones, la célula utiliza otros sistemas. Uno de ellos, denominado reparación por escisión de nucleótidos, reconoce daños que provocan deformaciones o "abultamientos" en la molécula de ADN. El ejemplo clásico de esta clase lo constituyen los dímeros de pirimidina.

El mecanismo más estudiado mediante el cual se repara este tipo de lesiones es el que involucra a la enzima llamada endonucleasa UvrABC, la cual reconoce y elimina no sólo los dímeros de pirimidina sino muchos otros tipos de lesión. La subunidad A se adhiere a la doble hélice y al incorporarse la subunidad B se reconoce el sitio alterado en el que se encuentra el dímero. Una vez localizado el daño se agrega la subunidad C, la cual va a cortar la cadena, liberándose entonces un oligonucleótido que contiene la región dañada. (Figs. 13 y 14).

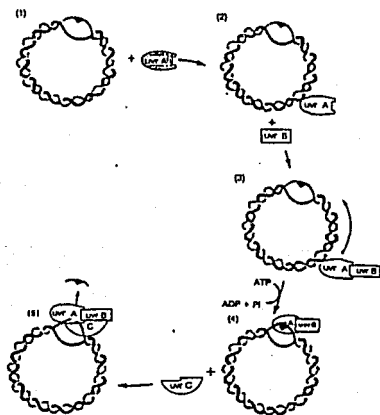


FIG.13.-ACCION DE LA ENZIMA UVR ABC (FRIEDBERG,1985).

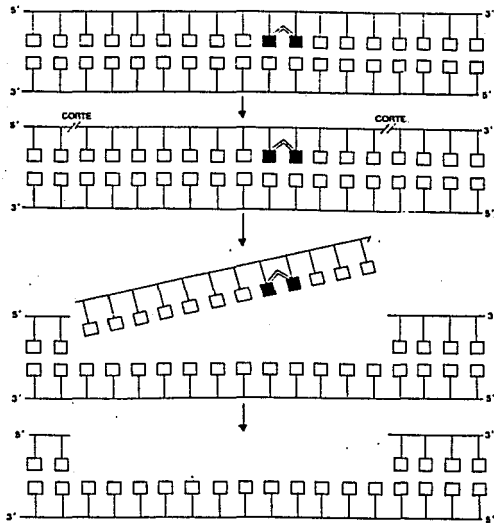


FIG.14.-LESION DE ADN LIBERADA EN FORMA DE OLIGONUCLEOTIDO (FRIEDBERG, 1985).

Los huecos que dejan cualquiera de las endonucleasas antes descritas son resintetizados posteriormente por la ADN-polimerasa I. (Friedberg, 1985).

Reparación por Recombinación

Como es sabido la recombinación en los seres vivos implica el intercambio de material genético de una hebra de ADN a otra. Este sistema es un factor muy importante en la variabilidad genética, ya que de este modo se pueden adquirir diferentes características, dando lugar a la aparición de nuevas líneas. Para que esto ocurra es necesario que existan al menos dos copias de ADN y se presenta tanto en organismos haploides como diploides. El proceso clásico de recombinación podría describirse de la siguiente forma: la molécula de ADN se abre por acción enzimática y empiezan a separarse las dos cadenas. Al llegar a un sitio específico se corta una de las bandas, dejando así un extremo 3'-OH libre. Este extremo libre se va alargando al seguir separándose las dos hebras y con la ayuda de ciertas enzimas específicas, se traslada hasta donde se encuentra otra copia de ADN, apareándose entonces con la secuencia homóloga. De este modo cada molécula queda con un tramo de la otra.

El mecanismo de recombinación puede también reparar rupturas o huecos en la molécula de ADN, permitiendo al mismo tiempo que la célula pueda tolerar temporalmente otros tipos de lesiones (Smith, 1989).

Existe cierto tipo de lesiones que inhiben o bloquean la duplicación del ADN (los dímeros de pirimidinas, por ejemplo). Cuando la ADN-polimerasa encuentra este tipo de anomalías en la hebra que sirve como molde, deja de insertar nucleótidos y continúa su labor más adelante, quedando un hueco justo donde

se localiza el daño. Uno de los caminos que puede seguir la célula para tolerar el daño es la vía de recombinación RecBCD (Fig. 15). Por esta vía pueden obtenerse dos moléculas completas de ADN, a pesar de no haber sido reparado el daño. (Friedberg,1985; Smith,1988; West y col.,1981).

Otro de los caminos que puede seguir la recombinación es la llamada vía RecF, que actúa preferentemente cuando existen rupturas de doble cadena en el material genético. Hasta el momento no se conoce con precisión el mecanismo de acción de este sistema, sin embargo se han descubierto varios genes que intervienen en él, algunos de los cuales forman parte de la respuesta SOS. Entre estos se encuentra *recN* el cual al parecer es indispensable en la reparación de rupturas dobles (Lloyd y col.,1983; Picksley y col.,1984).

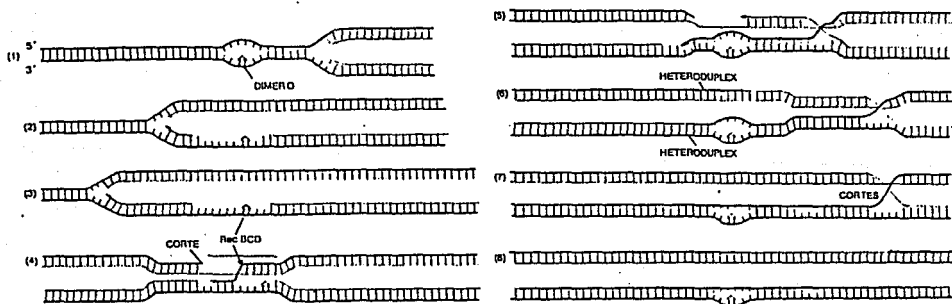


FIG. 15.-TOLERANCIA DE UNA LESION GENETICA POR MECANISMOS DE RECOMBINACION (FRIEDBERG,1985).

SISTEMAS DE TOLERANCIA Y REPARACION
INDUCIBLES POR DAÑO GENETICO

Respuesta al Estrés Oxidativo

Todo organismo que utiliza oxígeno molecular está expuesto a los productos resultantes de la acción de esta molécula durante la fosforilación oxidativa. Estos productos incluyen al ion superóxido (O_2^-), peróxidos (como el de hidrógeno) (H_2O_2) y el ion hidroxilo (OH^-). En condiciones fisiológicas se ha visto que los superóxidos se transforman rápidamente en H_2O_2 y O_2 ayudados por la acción de la enzima superóxido dismutasa y/o por algún metal de transición. El H_2O_2 resultante es prácticamente inofensivo para las biomoléculas, pero cuando reacciona con metales como el Fe libera radicales OH que, como ya se mencionó en el caso de la radiación ionizante, son sumamente reactivos. Los agentes oxidantes pueden actuar sobre lípidos, proteínas, membranas y sobre cualquier componente de la molécula de ADN. Tanto en *E. coli* como en otras bacterias se ha observado la acción de diversas enzimas que protegen a la célula del daño producido por estos agentes.

Christman y col. (1985) describieron un tipo de respuesta adaptativa por medio de la cual las bacterias se volvían resistentes a dosis de H_2O_2 , de otro modo letales. Esto ocurría cuando se trataban previamente con concentraciones bajas de este mismo compuesto y notaron que el fenómeno iba acompañado de un incremento en los niveles de varias proteínas. En esta

respuesta están involucrados varios sistemas de regulación, de los cuales el más conocido es el controlado por el gen *oxyR* (Demple,1991). El producto de este gen controla positivamente la transcripción de nueve proteínas, entre las que se encuentran la catalasa y la alquil hidropéroxido reductasa. Se supone que este sistema se encarga principalmente de proteger a la célula de los agentes oxidantes pero es posible que también esté implicado en mecanismos de reparación (Christman y col.,1985). Recientemente Goerlich y col.(1989) reportaron que los diversos agentes oxidantes inducen la respuesta SOS (que se describe más adelante), la cual sólomente se activa cuando existe algún daño en el material genético.

Respuesta al Choque Térmico

Tanto en *E.coli* como en organismos superiores, incluso en el ser humano, se ha observado un aumento de la síntesis de ciertas proteínas inmediatamente después de un incremento en la temperatura o bien al tratar a las células con etanol. Se considera que la señal para que aumente la síntesis de estas proteínas está determinada por daño en la membrana celular (Christman y col.,1985).

En *E.coli* la respuesta al choque térmico está controlada por el gen *hptR* que actúa como regulador positivo sobre aproximadamente 19 genes entre los que se encuentra *rpoD*, el cual codifica para la subunidad sigma (σ) de la ARN polimerasa, y los genes *dnaK* y *J*. La proteína HptR presenta una marcada

homología con RpoD lo que sugiere que ésta interactúa con la ARN polimerasa para reconocer a los promotores de los genes involucrados en el sistema.

El hecho de que la respuesta al choque térmico pueda inducirse por cambios leves de temperatura indica que este sistema funciona como un tipo de adaptación. El repentino aumento de ciertas proteínas ocurrido durante los primeros minutos posteriores al incremento de temperatura, que alcanza un cierto equilibrio 15 minutos después, apoya tal suposición. Las bacterias *dnaK* transcriben las proteínas de este sistema por un tiempo mucho más prolongado que las cepas silvestres, de lo que se puede deducir que éste es un proceso de adaptación autorregulable (Gottesman, 1984).

Al parecer la respuesta al choque térmico interactúa con otros sistemas, como la respuesta al estrés oxidativo y el sistema SOS. Se ha observado que algunos agentes inductores de SOS producen también la respuesta al choque térmico; el gen *lon*, que forma parte de esta última, codifica para una proteasa que degrada a la proteína Sula, la cual es responsable de la filamentación en la respuesta SOS. Walker (1984) propone que esta interacción es un tipo de regulación para las proteínas SOS que, una vez reparado el daño, pudieran ser perjudiciales para la célula. Se ha visto también que bacterias tratadas con dosis subletales de H₂O₂ se vuelven resistentes a la muerte por temperaturas de 50°C. Al estudiar este fenómeno se comprobó que *oxyR* puede actuar como regulador positivo para tres de los genes de la respuesta al choque térmico (Christman y col., 1985; Gottesman, 1984).

Respuesta SOS

En 1975, Radman describió la existencia en *E. coli* de un sistema que sólo se activaba al ocurrir algún daño en el ADN. Observó que al tratar a las bacterias con luz UV se incrementaba en forma considerable la expresión de ciertos genes, a la vez que aumentaba la tasa de mutaciones. Lo llamó SOS ya que pensó que se trataba del último recurso que tenía la bacteria para sobrevivir. Actualmente se conocen varios sistemas inducibles por daños en el genoma, si bien el sistema SOS es el mayor, más complejo y mejor estudiado de ellos.

La vía SOS está conformada por aproximadamente 20 genes que actúan ya sea en diversos mecanismos de reparación (como serían los genes *uvrABC*) o bien confiriendo a la célula características que le permiten tolerar las lesiones.

La inducción de este sistema está controlada por el producto de los genes *recA* y *lexA* de los que depende la transcripción de todos los demás en esta vía, incluyendo los de ellos mismos. En condiciones normales el producto de *lexA* actúa como represor adhiriéndose al operador de cada gen SOS, lo cual impide su transcripción (a pesar de lo cual muchos de estos genes se expresan en niveles significativos). Al parecer *LexA* se une a la secuencia TATCGATATA-A-ACAGTA común a todos los operadores SOS, y se ha observado además que las secuencias adyacentes a este sitio pueden ayudar a la unión de dicha proteína (Walker, 1984).

Al ocurrir un daño en el ADN se genera una "señal de auxilio", que va a activar a la proteína *RecA*, la cual cambia sus funciones normales de recombinación y comienza a

comportarse como una proteasa, actuando sobre el represor del sistema. RecA activada parte a LexA en el enlace Ala-Gly que se encuentra aproximadamente a la mitad de la proteína, generando dos fragmentos peptídicos. Sin embargo no basta con aumentar los niveles de RecA para inducir el sistema, sino que es necesaria además una señal de inducción para que aquélla comience a degradar a LexA. Se ha observado *in vitro* que RecA se activa al unirse con ADN de una banda y nucleósidos trifosfatados, aunque esto todavía no ha sido comprobado *in vivo*.

Al ser hidrolizado LexA comienza la transcripción de varios de los genes SOS, incluyendo a *recA*. Esta transcripción

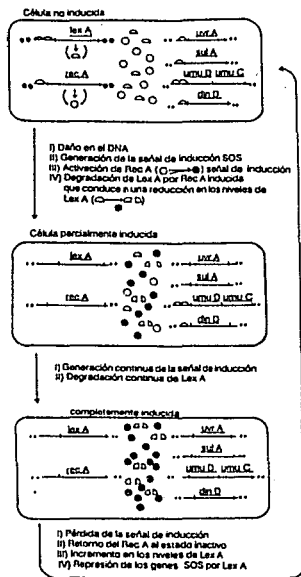


FIG.16.-REGULACION DEL SISTEMA SOS (WALKER, 1984).

es diferencial, ya que depende de que tan fuertemente adherida esté LexA y cuántas moléculas estén unidas a cada operador. Los operadores a los cuales LexA se una débilmente serán los primeros en expresarse. Si el daño es lo suficientemente extenso seguirán activándose más moléculas de RecA y la inducción del sistema SOS será total. Una vez reparado el daño se pierde la señal de inducción, RecA vuelve a sus funciones normales, aumentan los niveles de LexA y nuevamente se reprime todo el sistema (Fig.16) (Walker,1984, 1987).

Quillardet y Hofnung (1985) aprovecharon el carácter inducible de la vía SOS para desarrollar una prueba de agentes genotóxicos llamada cromoensayo. Para esta prueba construyeron cepas de *E.coli* en las cuales fusionaron el fago μ (que a su vez lleva el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa y es integrante normal del operón de la lactosa) en *sulA*, perteneciente al sistema SOS. Este gen es de los primeros en inducirse, y participa en la inhibición de la división celular. Estas cepas tienen a su vez un defecto en el mencionado operón de la lactosa, por lo que la síntesis de β -galactosidasa queda controlada por el operador *sulA*, transcribiéndose sólo cuando se inducen las funciones SOS (Fig.18). Además en estas cepas incluyeron la transcripción constitutiva de un gen ajeno a la vía SOS, el gen de la fosfatasa alcalina, característica que sirve para indicar la síntesis de proteínas en general (Fig.17).

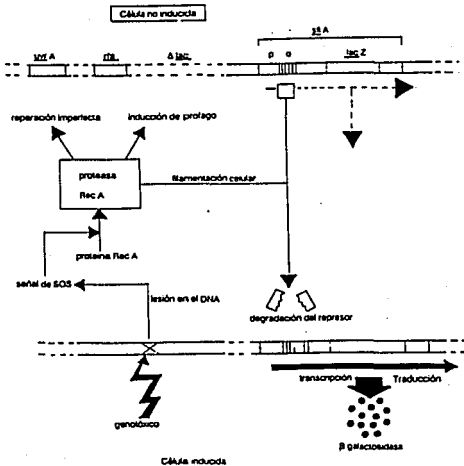


FIG.17.-ESQUEMA DEL CROMOENSAYO (QUILLARDET,1985).

Utilizando esta prueba, en 1989 Quillardet y col. reportaron una serie de experimentos en los que probaron el cromosoma con tres distintos tipos de radiación ionizante: rayos gama, neutrones y partículas α aceleradas. La dosis mínima de radiación gama que reportan para inducir SOS es de aproximadamente 5 Gy.

Por esa época, en trabajos realizados en el laboratorio de genética microbiana del ININ se estudió la respuesta SOS en bacterias irradiadas con dosis relativamente bajas de radiación gama, utilizando también el cromosoma. Se observó que al irradiar a las bacterias de la misma cepa usada por Quillardet y Hofnung (PQ37), deficiente en un mecanismo de reparación por

escisión, a razón de dosis baja se obtenía en la curva de dosis-respuesta una meseta que se extendía desde 8 hasta 32 Gy. Esto no ocurría al irradiarlas con una razón de dosis aproximadamente seis veces mayor. Estas diferencias apuntaban hacia la posible activación de un mecanismo de reparación inducible, cuya función impedía el incremento de la respuesta (Breña, 1989, Breña y col., 1990).

El presente trabajo tiene por objeto investigar cuáles son los mecanismos que pudieran estar ocasionando el retraso en la respuesta observado con razones de dosis bajas, y de ser posible sensibilizar el sistema para inducir las funciones SOS con dosis de radiación cada vez menores.

MATERIAL Y METODOS

Las bacterias utilizadas a lo largo de los experimentos se citan en la tabla I. De acuerdo a convenciones internacionales de microbiología sólo se reportan los genes no funcionales de cada cepa.

TABLA I

E. coli	GENOTIPO	ORIGEN
PQ30.....	F ⁻ , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>his</i> , <i>pyrD</i> , <i>thi</i> ,..... <i>trp::Muc⁺</i> , <i>srl::Tn 10</i> , <i>rpoB</i> , <i>sfiA::Mud(Ap lacZ)</i> , <i>cts</i> , <i>lac AU169</i> , <i>galE</i> , <i>galY</i> , <i>phoC</i> , <i>wt</i> .	Quillardet, Paris.
PQ37.....	igual a PQ30 pero <i>uvrA</i> y <i>rfa</i>	Quillardet, Paris.
OG100.....	igual a PQ30 pero Δ <i>oxyR4</i> , <i>btuB</i>	Quillardet, Paris. y sin Tn10.
IN28.....	igual a OG100 pero <i>tyrA::Tn10</i> ,.....	Este trabajo recN262.
SP216.....	F ⁻ , <i>lacY</i> , <i>ara</i> , <i>xyl</i> , <i>mtl</i> ,..... <i>gal</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>pro</i> , <i>his</i> , <i>thi</i> , <i>argB</i> , <i>tsx</i> , <i>recB</i> , <i>recC</i> , <i>sbsBis</i> , <i>tyrA::Tn10</i> , <i>recN 262</i> , <i>strA</i> , <i>supE</i> .	Lloyd, Nottingham,

En todas las cepas, excepto en SP216, está fusionado el gen *lacZ* a *sfiA* por medio del fago Mud el cual lleva además la información necesaria para conferir resistencia a ampicilina.

La construcción de cepas se efectuó por el método de transducción general mediante el fago P1 (Miller, 1972). Este fago tiene la particularidad de poder acarrear cualquier gen de la bacteria que esté lisando. Cerca del final de la lisis, cuando el fago se "empaca" dentro de su envoltura proteica y el ADN bacteriano está siendo degradado, se llegan a introducir trozos de ADN celular de aproximadamente la misma longitud del fago. Se forman así las llamadas partículas transductantes que conservan la capacidad de infectar otras cepas. Dado que al llevar ADN bacteriano comparten secuencias homólogas, pueden integrarse por recombinación al genoma del hospedero bacteriano transfiriéndose así caracteres de una línea celular a otra. Si dos o más genes se localizan en sitios cercanos entre sí, pueden ser capturados en la misma partícula transductante, dándose así una cotransducción. Gracias a esta característica un gen puede servir como indicador de la presencia de otro gen cercano. La probabilidad de que dos genes pasen al mismo tiempo de una bacteria a otra es inversamente proporcional a la distancia que exista entre ellos; los marcadores que estén separados por menos de 0.5 minutos tendrán una posibilidad de 35-95% de cotransducir, para los que estén separados 1 minuto la probabilidad será de 4-26% y los separados entre 1.5 y 1.8 minutos tendrán posibilidades menores de 1%.

Para el presente trabajo se construyeron cepas deficientes en los genes *recN* y *oxyR*, utilizando como progenitores a OG100 y SP216 (ver. tabla I). Se pensó en estos caracteres ya que el

gen *recN* es inducible, forma parte de la respuesta SOS y está involucrado en un mecanismo que participa en la reparación de las rupturas dobles en el ADN (Picksley y col., 1984), que como ya se mencionó es un tipo de daño relativamente común cuando se exponen los sistemas biológicos a radiación ionizante. OG100 por su parte, podía contribuir a la sensibilización del sistema al efecto indirecto de la radiación debido a la deficiencia en el gen *oxyR*, la cual acentúa la genotoxicidad de los agentes oxidantes sobre las bacterias en esta cepa.

A partir de un lisado de P1 proveniente de SP216 se infectó a OG100; en SP216 se encuentra el transposón Tn 10 fusionado a *tyr A*, que mapea muy cerca de *rec N*, así que se usó como indicador de la transducción (Tn 10 confiere resistencia a tetraciclina). Dado que OG100 es resistente a ampicilina gracias al fago μ , la selección se hizo directamente sembrando a los presuntos transductantes en medio de Luria con estos antibióticos. Se probó la sensibilidad a mitomicina C, que es un agente genotóxico de los llamados radiomiméticos, se aislaron los mutantes más sensibles y se probó su supervivencia a la radiación gama. Se seleccionó al transductante IN28 debido a que, al tratarlo con mitomicina C, la inducción de la respuesta SOS fue mucho más marcada que en las demás cepas.

Una vez seleccionado el transductante se efectuaron curvas de supervivencia de todas las cepas. La irradiación tanto para la supervivencia como para el cromosoma se llevó a cabo de la siguiente manera: De un cultivo en fase estacionaria se tomaron 0.2 ml, se diluyeron en 10 ml de caldo de Luria-Bertani (LB) y

se incubaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico que equivale a una absorbancia a 590 nm de 0.4, donde la concentración de bacterias es de 2×10^8 bacterias/ml. A continuación se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7, se distribuyeron en tubos de vidrio (2 ml por tubo) y se expusieron a la radiación gama. Se utilizaron 2 diferentes fuentes de ^{60}Co con razones de dosis de 18 Gy/min (Gammacell) y 2.6 Gy/min (Vick Rad), respectivamente. Se hicieron mediciones paralelas de las diferentes dosis por medio de la técnica de termoluminiscencia (Azorín, 1990). Después de la irradiación se diluyeron las muestras en amortiguador de fosfatos y se sembraron en cajas de medio de LB sólido (tres cajas por cada dilución). Se incubaron a 37°C por aproximadamente 20 horas. Pasado este tiempo se contaron las colonias y se calculó un porcentaje de supervivencia de cada caso tomando al testigo como el 100% .

Para los experimentos de cromoensayo se utilizó el siguiente método: después de la irradiación se diluyeron las muestras en LB y se incubaron por un tiempo que varía según la cepa, para inducir la actividad de SOS al máximo. Pasado este tiempo se tomó 1 ml de cada muestra y se dividió en volúmenes iguales en tubos de ensayo, unos con el amortiguador específico para β -galactosidasa y otros con el de la fosfatasa alcalina; ambos contenían un detergente (SDS) que liberó a las enzimas en el medio. Se incubaron por unos minutos a 37°C y se agregaron 0.5 ml del sustrato específico para cada enzima (ONPG para la

β -galactosidasa y PNPP para la fosfatasa alcalina). Al ser hidrolizados por las enzimas respectivas se liberó un colorante, observándose una tonalidad amarilla. Una vez agregado el sustrato se incubó todo a 37°C hasta que se alcanzó una coloración evidente y se midió por espectrofotometría. Esta coloración indica la actividad de las enzimas, lo que en el caso de β -galactosidasa es función de la cantidad de daño producido en el ADN.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia se calculó la relación entre las unidades de actividad enzimática de β -galactosidasa y de fosfatasa alcalina mediante la fórmula:

$$R = \frac{A_{420} B X t_P}{A_{420} P X t_B}$$

Donde:

$A_{420}B$ = Absorbancia a 420 nm de β -galactosidasa

$A_{420}P$ = Absorbancia a 420 nm de fosfatasa alcalina

$t\beta$ = Tiempo de incubación de β -galactosidasa después de agregado el sustrato.

t_P = Tiempo de incubación de fosfatasa alcalina después de agregado el sustrato.

Se obtuvo así el valor R para cada tratamiento y para el testigo. Para poder conocer el grado de inducción en cada tratamiento se calculó el factor de inducción (FI), el cual fue el cociente del valor R de cada tratamiento entre el del testigo.

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de inducción de SOS en las distintas cepas, se realizaron

experimentos de cinética enzimática, variando los tiempos de incubación posteriores a la irradiación. Cada 30 minutos se tomaron alícuotas de la muestra y se trataron de acuerdo con el método anteriormente descrito. Se obtuvieron los FI, expresándolos en forma gráfica en función del tiempo para determinar así el punto en el que presentó el máximo de inducción SOS.

RESULTADOS

En la Fig. 18 se muestran las curvas de supervivencia a radiación gama de las distintas cepas utilizadas. La que tiene la supervivencia más alta es PQ30, de aproximadamente 80%. A continuación le siguen OG100, IN28, PQ37 y SP216, con valores de 12%, 7%, 3% y 0.07% respectivamente. Todas estas cepas muestran un hombro hasta los 50 Gy con excepción de SP216, en la que hay una caída muy pronunciada desde el principio.

Los experimentos de cinética enzimática indican que las cepas IN28, OG100 y PQ30 llegan al máximo de inducción de SOS entre los 30 y los 60 minutos, mientras que PQ37 lo hace entre los 90 y los 120 minutos (Figs. 19 y 20).

En la gráfica de inducción de SOS a razón de dosis alta (Fig. 21) se puede apreciar que PQ30 es la cepa que tiene el valor de estimulación de SOS más bajo, obteniéndose un aumento en el factor de inducción (FI) de solamente 6 veces. PQ37 y OG100 muestran entre sí una respuesta muy similar, mientras que IN28 presenta una muy marcada diferencia con respecto a las demás cepas, llegando a aumentar el FI hasta casi 50 veces. Puede verse que en todas las curvas se incrementa la respuesta conforme aumenta la dosis de radiación.

En la gráfica de inducción a razón de dosis baja, (Fig. 22) nuevamente es PQ30 la que tiene la respuesta más baja, logrando apenas duplicar la tasa basal de SOS a los 32 Gy. En la curva de PQ37 se aprecia la meseta mencionada anteriormente, que va de 8 a 32 Gy, elevándose después la pendiente hasta llegar a inducirse 9 veces las funciones SOS. Algo similar ocurre en

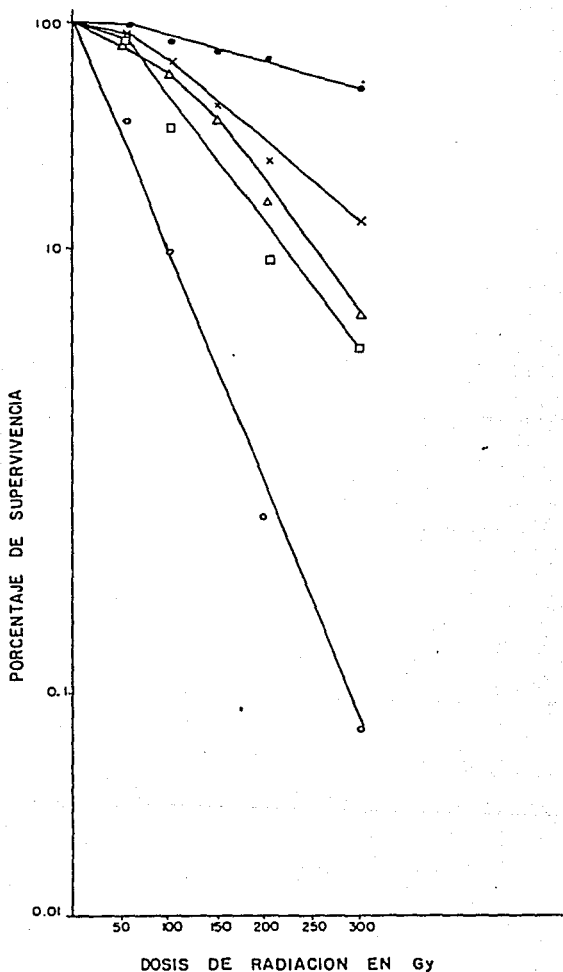


Fig. 18.-Supervivencia de las cepas de E.coli con diferentes dosis de radiación gama a razón de dosis de 18 Gy/min. ●-PQ30; □-PQ37; ×-OG100; ○-SP216; ▲-IN28.

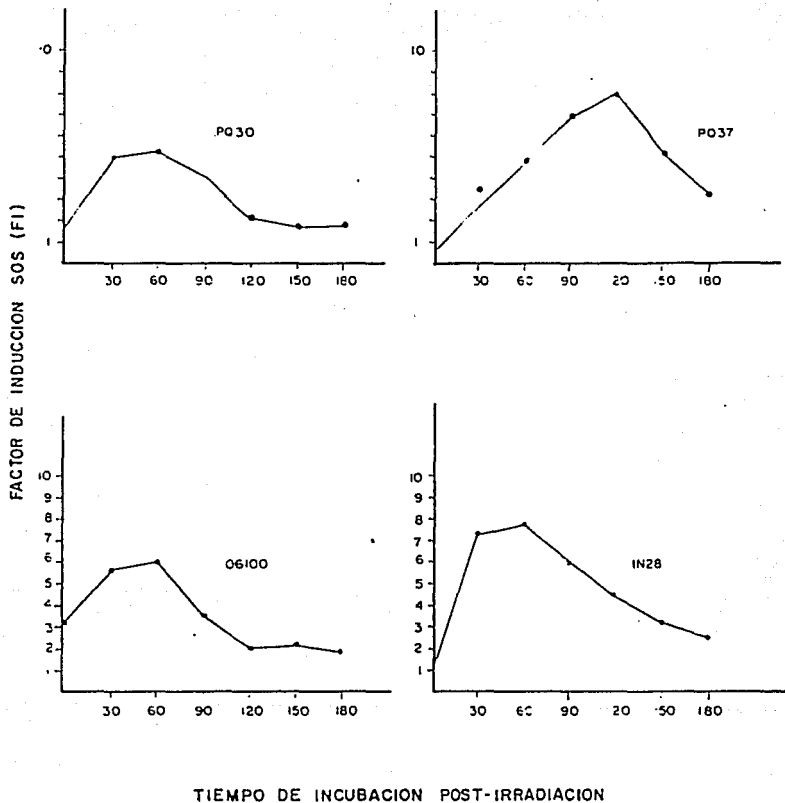
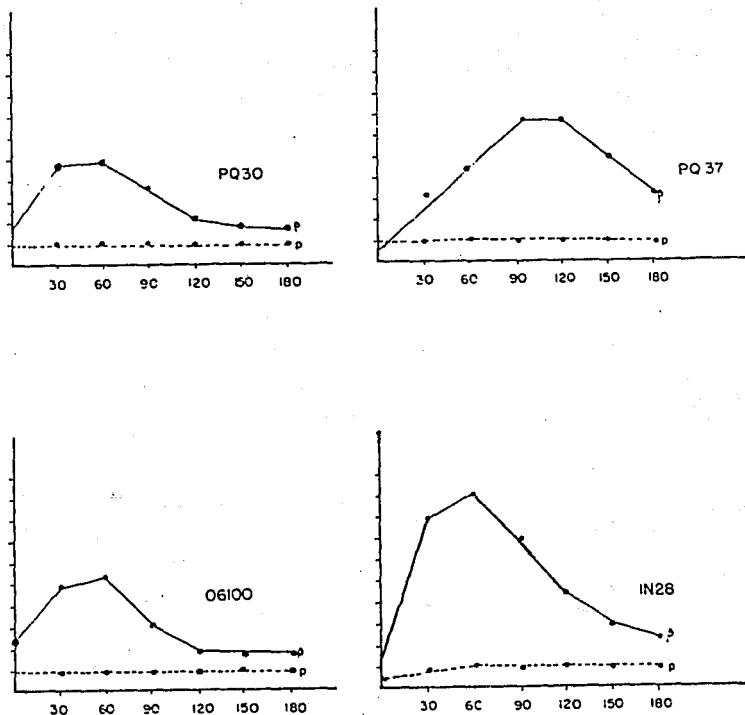


Fig. 19.-Factor de inducción de SOS en función del tiempo de incubación posterior al tratamiento con radiación. La dosis utilizada fue de 26 Gy a razón de 2.6 Gy/min. Se observa que el máximo de inducción SOS se alcanza alrededor de los 60 min, excepto en PQ37 en donde ocurre hasta los 120 min.

INCREMENTO (Δ) DE LAS UNIDADES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA



TIEMPO DE INCUBACION POST IRRADIACION

Fig. 20.-Actividad de β -galactosidasa y fosfatasa alcalina en función del tiempo de incubación posterior a la irradiación, de acuerdo con la relación de las actividades enzimáticas de las bacterias tratadas entre las de los testigos. Como puede observarse, β -gal, dependiente de SOS, va aumentando con el tiempo hasta alcanzar un máximo. La fosfatasa alcalina no cambia, indicando que la radiación (26 Gy) no afecta la síntesis de proteínas, la cual permanece estable.

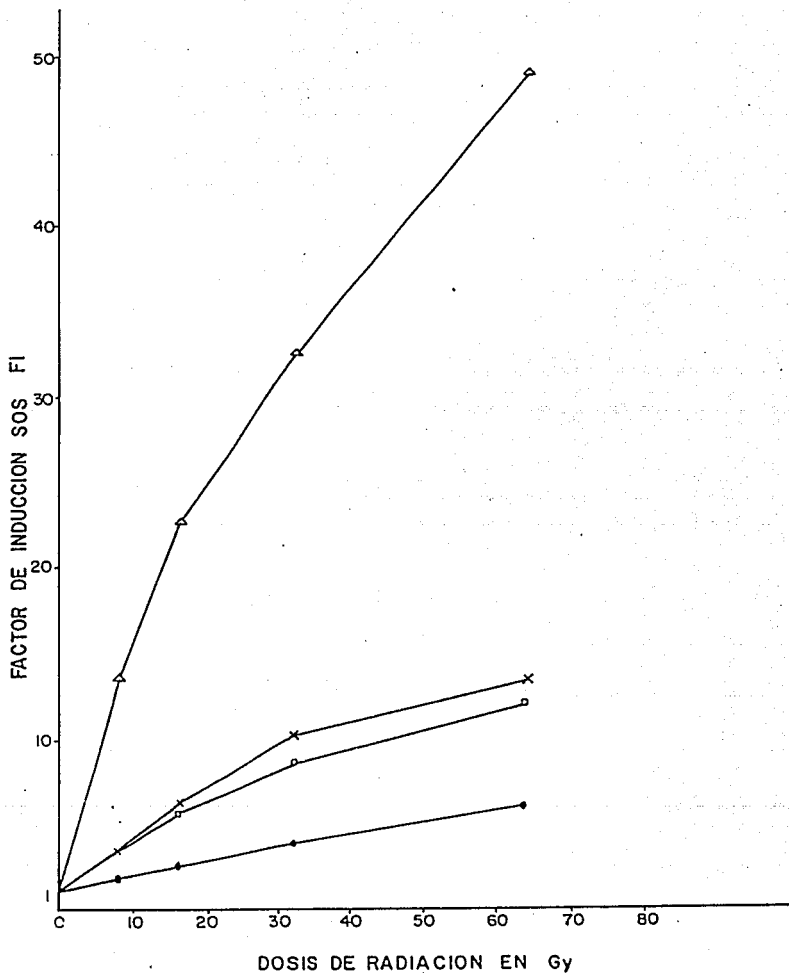


Fig. 21.-Inducción de las funciones SOS a razón de dosis alta (18 Gy/min). ●-PQ30; □-PQ37; x-KOG100; △-IN28.

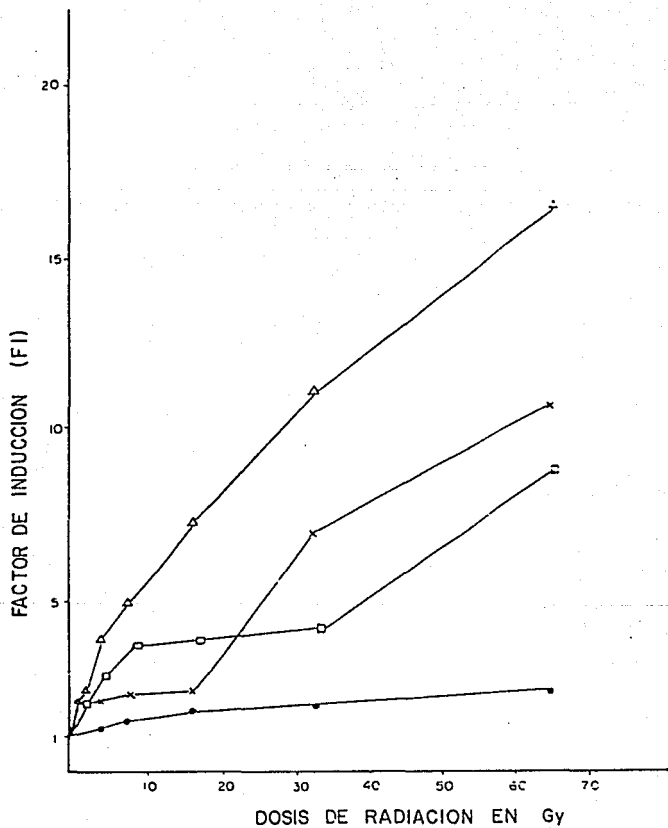


Fig. 22.-Inducción de las funciones SOS a razón de dosis baja (2.6 Gy/min). ●-PQ30; □-PQ37; ×-OG100; △-IN28.

OG100 sólo que la meseta va de 4 a 16 Gy, mientras que el FI alcanza un valor de 11 con la dosis mayor. Tanto en PQ37 como en IN28 aumenta el FI al doble a partir de 2 Gy de radiación gama. De nuevo se observa una respuesta mucho mayor en IN28, desapareciendo completamente la meseta presente en PQ37 y OG100. Además en este caso el FI se duplica con sólo 1 Gy de radiación gama.

DISCUSION

Como era de esperarse la cepa que tiene la supervivencia más alta es PQ30, la cual, por tener todos sus mecanismos de reparación funcionales, tiene más posibilidades de recuperarse de las lesiones ocasionadas por la radiación.

La deficiencia en el mecanismo de reparación por escisión hace que PQ37 sea más sensible al efecto letal de la radiación. Como ya se ha dicho la vía UvrABC puede reconocer diversos tipos de lesiones en el ADN, así que cuando falta muchas de ellas permanecen sin reparar.

Dado que *oxyR* controla la actividad de un sistema que protege a la célula de los efectos provocados por agentes oxidantes, es de suponerse que la carencia de este sistema sensibilice a OG100 al ataque de los radicales libres producto de la radiólisis.

Los defectos en los genes *oxyR* y *recN* provocan una disminución en la supervivencia de IN28 mayor a la observada en OG100, probablemente debido a que *recN* participa en la reparación de rupturas dobles en el ADN (Picksley y col., 1984). Sin embargo, como la sensibilidad no es tan grande como en la progenitora SP216, se confirma que hay además otros genes que colaboran en la reparación de ese tipo de lesiones. SP216 muestra la pendiente más pronunciada, lo que indica que los mecanismos de recombinación representados por los genes *recB*, *recC* y *recN* juegan un papel importante en la reparación y/o tolerancia de los daños ocasionados por la radiación. Esto concuerda con la proposición de Sargentini y Smith (1986), en

cuanto a que esos genes son necesarios para reparar rupturas dobles en el ADN.

Los resultados obtenidos al investigar la cinética de inducción SOS con radiación gama indican que, salvo en PQ37, la actividad máxima se logra entre 30 y 60 minutos. Los datos obtenidos con PQ37 concuerdan con Quillardet y Hofnung (1985), quienes establecen que el tiempo óptimo de incubación para PQ37 se encuentra entre 90 y 120 min. Craig y Roberts (1981) sugieren que la activación de RecA y la subsiguiente inducción de SOS se debe a la presencia de ADN de una banda. Dado que la vía UvrABC elimina las lesiones en forma de oligonucleótidos, se considera que la diferencia en el tiempo de inducción se debe posiblemente a que el defecto en *uvrA* podría estar retardando la señal de inducción necesaria para la función proteolítica de RecA.

Kozubek y col. (1990) mencionan que en PQ37 se induce SOS inmediatamente después de la irradiación, regresando a la transcripción basal pasados 200 minutos. Sin embargo, sus condiciones de experimentación difieren de las de este trabajo en dos aspectos: en primer lugar el irradiar en un medio completo favorece el que las funciones SOS se induzcan durante y/o inmediatamente después de la irradiación, y en segundo lugar las dosis altas utilizadas por ellos producen una mayor cantidad de rupturas dobles, las cuales son por sí mismas inductoras de dichas funciones.

La dosis de inducción de SOS en PQ30 es la más alta de todas debido a que en un momento dado todos sus sistemas de reparación pueden intervenir para eliminar las lesiones, por lo

tanto la probabilidad de activar SOS disminuye considerablemente. El hecho de que la pendiente de la curva sea además muy baja confirma lo anterior.

El que en PQ37 y OG100 se duplique la tasa basal de SOS con sólo 2 Gy (Fig. 22) sugiere que los genes *oxyR* y *uvrA* están implicados en la reparación de daños ocasionados por radiación, mientras que el descenso de la pendiente con respecto a la inicial, sugiere la activación de algún mecanismo inducible de reparación. Comparando las dos mesetas se observa que la de OG100 es menos prolongada, lo que indica que el gen *oxyR* es también en parte responsable de la respuesta. Los resultados obtenidos con el transductante IN28 donde la suma de las deficiencias en *oxyR* y en *recN* eliminan completamente la meseta, confirman lo anterior. El hecho de que en IN28 se logre no solamente duplicar la respuesta SOS con sólo 1 Gy, sino obtener además la inducción más elevada hace pensar que la gran sensibilidad a la radiación de IN28 con respecto a las otras cepas es debida a la carencia de *recN*. Esta suposición está de acuerdo con lo propuesto por Picksley y col. (1984) y por Sargentini y Smith (1986), quienes sugieren que *recN* participa en la reparación de rupturas dobles en el ADN.

Al comparar las gráficas de inducción de SOS con las de supervivencia puede verse que la mayor mortalidad de las bacterias no significa necesariamente que la respuesta SOS tenga que ser mayor. La supervivencia está determinada por una gran cantidad de factores que actúan en un momento dado para dar a las células la posibilidad de soportar cualquier presión de selección de manera que pueda seguir reproduciéndose, dando

lugar a la aparición de colonias visibles. Uno de estos factores es la respuesta SOS la cual se induce solamente al existir lesiones en el genoma y confiere a las bacterias ciertas características que les dan mayores posibilidades de soportar dichas lesiones. Se puede observar que en todas las cepas, salvo en PQ37, la supervivencia más alta coincide con una menor respuesta SOS. PQ37 muestra una baja supervivencia lo mismo que una baja inducción con respecto a IN28 y OG100. Es posible que el descenso en la supervivencia pudiera deberse al retraso que presenta esta cepa en la inducción de las funciones SOS. OG100 tiene una mayor supervivencia que PQ37 y también una mayor inducción de SOS, lo cual está de acuerdo con la idea de que a mayor activación de esta vía mayores probabilidades habrá de supervivencia. IN28 muestra un ligero descenso en la supervivencia con relación a OG100, sin embargo, dada la importancia que tiene el gen *recN* en la reparación de rupturas dobles se hubiera podido pensar que sería aún más sensible al efecto letal de la radiación. El que la mortalidad de IN28 no sea mayor puede deberse precisamente a la elevada inducción de la respuesta SOS, lo cual se traduciría en una mayor tolerancia al daño.

Hay, sin embargo, otras hipótesis posibles como la participación en la supervivencia de genes con mayor relevancia como *recA*, *recB* y *recC*, o también a que por tratarse de dosis relativamente bajas la contribución de las rupturas dobles al daño total es todavía poca. Todas estas posibilidades, que no se excluyen entre sí, quedan todavía por investigarse.

CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos sugieren que los genes *recN* y *oxyR* son los responsables de la meseta observada en PQ37 y OG100 al inducir SOS con radiación ionizante, protegiendo contra ella y reparando los daños ocasionados tanto por el efecto directo de la radiación como por los radicales libres producto de la radiólisis del agua.

Gracias a la deficiencia en el carácter *recN* fue posible sensibilizar el sistema, lográndose duplicar la inducción de las funciones SOS con sólo 1 Gy de radiación gamma. Se obtuvo además una respuesta lineal en una parte de la curva de dosis-respuesta del transductante IN28, lo que permite considerar la posibilidad de utilizar más adelante este sistema como un dosímetro biológico.

APENDICE I

Medios de Cultivo y Amortiguadores

*Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4

-Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	120 ml 0.2 M
-Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)	880 ml 0.2 M

*Caldo de Luria

-Cloruro de sodio	10 g
-Extracto de levadura	5 g
-Bactotripton	10 g
-Agua bidestilada	1 L

*Agar de Luria

-Cloruro de sodio	10 g
-Extracto de levadura	5 g
-Bactotripton	10 g
-Agar bacteriológico	12 g
-Agua bidestilada	1 L

Amortiguador B (para β -galactosidasa)

- Na_2HPO_4	16.1 g
- NaH_2PO_4	5.5 g

-KCl	0.75 g
-MgSO ₄ .H ₂ O	0.25 g
-SDS	1 g
-β-Mercaptoetanol	2.7 ml

Se ajusta a pH 7 y se afora a 1 L

Amortiguador P (para fosfatasa alcalina)

-Tris (hidroximetil aminometano) [C ₄ H ₁₁ NO ₃]	121 g
-SDS	1 g

Se ajusta a pH 8.8 y se afora a 1 L

Reactivos

ONPG (o-nitrofenil galactopiranososa) 4mg/ml

-ONPG	400 mg
-Na ₂ HPO ₄ (0.1M)	61 ml
-NaH ₂ PO ₄ (0.1M)	39 ml

PNPP (p-nitrofenil fosfato) 4mg/ml

-PNPP	400 mg
-Amortiguador P	100 ml

* Se esterilizan en autoclave.

REFERENCIAS

- Arena, V. (1971). Ionizing Radiation and Life. Mosby, St. Louis. p.543
- Alberts, B. (1989). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Nueva York. p. 1218
- Azorín, J. (1990). Luminiscence dosimetry; theory and applications. Ed. Técnico Científicas, México. p. 108
- Breña, M. (1989). Inducción de las funciones SOS por radiación gama. Informe técnico-científico Radiobiol. 07/89, ININ.
- Breña-Valle, M., D. Alcántara-Díaz y V. Rojas-Martínez (1990). SOS induction by low doses of gamma radiation in *E. coli*. Mutat. Res. 234:45.
- Bueche, F. (1970). Fundamentos de Física. McGraw-Hill, México. pp. 728-780
- Casarett, A. (1968). Radiation Biology. Prentice-Hall, Englewood, Nueva Jersey. p. 367.
- Christman, M., RW. Morgan, FS. Jacobson y BN. Ames (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. Cell 41:753-762.
- Craig, NL. y JW. Roberts (1981). Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *E. coli* *recA* protein-directed cleavage of phage lambda repressor. J. Biol. Chem. 256:8039-8044.
- Demple, B. (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes. Annu. Rev. Genet. 25:315-337.

- Friedberg, E. (1985). DNA repair. Freeman, Nueva York. 613 p.
- Gentner, N. y M. Paterson (1984). Damage and repair from ionizing radiation. En: Reparable lesions in microorganisms. Eds. Hurst, A. y Nasim, A. Academic Press, EUA. pp 58-84.
- Goerlich, O., P. Quillardet y M. Hofnung (1989). Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *E.coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.*, 171:6141-6147.
- Goodenough, U. y R. Levine (1974). Genetics. Holt, Rinehart y Winston, EUA. 882 p.
- Gottesman, S. (1984). Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu. Rev. Genet.*, 18:415-441.
- Grosch, SD. y L. Hopwood (1979). Biological effects of radiation. Academic Press, EUA. 338 p.
- Kozubek, S., MM Ogievetskaya, EA. Krasavin, V. Drasil y J. Soska (1990). Investigation of the SOS response of *E.coli* after γ -irradiation by means of the SOS chromotest. *Mutat. Res.*, 230:1-7.
- Lehninger, A. (1980). Bioquímica. Omega, Barcelona. 1117 p.
- Lindahl, T. (1982). DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 51:61.
- Lloyd, RG, SM. Picksley y C. Prescott (1983). Inducible expression of a gene specific to the RecF pathway for recombination in *E.coli* K 12. *Mol. Gen. Genet.* 190:162-167.
- Miller, J. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, New York. 466 p.
- Picksley, SM., PV. Attfield y RG. Lloyd (1984) Repair of DNA double-strand breaks in *E.coli* K12 requires a functional recN

- product. Mol. Gen. Genet. 195:267-274.
- Quillardet, P. y M. Hofnung, (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutat. Res. 147:65-78.
- Quillardet, P., G. Frelat, VD. Nguyen y M. Hofnung (1989). Detection of ionizing radiation with the SOS chromotest, a bacterial short-term test for genotoxic agents. Mutat. Res. 216:251-217.
- Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible repair which is accompanied by mutagenesis. En: Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Hanawalt, PC. and RB. Setlow, Eds. pp. 355-367. New York.
- Sancar, A. y G. Sancar (1988). DNA repair enzymes. Annu. Rev. Biochem. 57:29-67.
- Sargentini, NJ. y KC. Smith (1986). Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. Radiat. Res. 107:58-72.
- Smith, G. (1988). Homologous recombination in procaryotes. Microbiol. Rev. 52:1-28.
- Smith, G. (1989). Homologous recombination in *E. coli*: Multiple pathways for multiple reasons. Cell 58:807-809.
- Walker, GC. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *E. coli*. Microbiol. Rev. 48:60.
- Walker, GC. (1987). The SOS response of *E. coli*. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and

Molecular Biology. Neidhardt, FC., JL. Ingraham, KB. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y HE. Umbarger, Eds. Am. Soc. Microbiol. 2:1346-1357. Washington, DC.

-Wang, CH y D. Willis (1965). Radiotracer methodology in biological science. Prentice-Hall, EUA. 382 p.

-West, SC., E. Cassuto y P. Howard-Flanders (1981). Mechanisms of *E.coli* RecA protein directed strand exchanges in post-replication repair of DNA. *Nature*. 294:659-662.