

00377 19



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DE LA RADIACION IONIZANTE DE
ALTO LET SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* CON
DIFERENTES CAPACIDADES DE REPARACION.**

298647

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
BIOL. JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. MATILDE BREÑA VALLE



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A todos, adulto o niño,
a los que enseguida cito
Quiero ofrendar con cariño
el presente manuscrito

Primero a Silvia Patricia
Mi compañera querida
Pues con su amor y pericia
Ha organizado mi vida

A mis hijos bienamados
Guillermo y Silvia Cristina
Pues ellos con su alma pristina
De dicha nos han colmado

A mis padres Gloria y Vinicio
Pues gracias a sus desvelos
Tengo yo ahora un oficio
Y me elevé de los suelos

A la runfla de bandidos
Que tengo yo por hermanos
Pues en las épocas duras
Siempre nos dimos las manos

A la maestra Matilde Breña
Por todo lo que se empeña
En iluminarme el coco
Aunque andemos a la greña

A Juan Antonio Correa
Por su ayuda y gran apoyo
Aún cuando por ayudarme
casi pierde la zalea

A todos los compañeros
Con los que a diario convivo
Mis parabienes sinceros
Por su amistad y cariño

Los que me faltaron, ya saben, ya saben...

Quiero dedicar el presente trabajo muy especialmente al Dr. Alfonso León de Garay por el impulso que le ha dado a la ciencia en México y a mí en lo personal.

A mi suegro, Sr. Alfonso González Luna (*qepd*)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los doctores Rafael Villalobos Pietrini, Patricia Ramos Morales, Jesús Javier Espinosa Aguirre, Adalberto Emilio Pimentel Peñalosa, Manuel Uribe Alcocer y Jesús Ramírez Santos por sus comentarios y opiniones para mejorar en lo posible el presente trabajo.

Mi especial agradecimiento a la M. en C. Matilde Breña Valle por su apoyo y guía a lo largo de toda mi vida profesional.

Agradezco a Juan Antonio Correa y a Alicia Hernández por su valiosa ayuda técnica.

Mi agradecimiento a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Biología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares bajo la dirección de la M. en C. Matilde Breña Valle.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
1.1 Radiación	2
1.2 Efecto de la radiación sobre sistemas biológicos	4
1.3 Daño al ADN	5
1.4 Respuesta celular a la radiación	7
1.5 Respuesta de adaptación al estrés oxidante	8
1.6 Reparación por escisión	10
1.7 Reparación por recombinación	13
1.8 Reparación de disparidades en las bases	15
1.9 Sistema SOS	16
2 ANTECEDENTES	19
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL Y METODOS	22
4.1 Aislamiento de mutantes sensibles a tetraciclina	22
4.2 Transducción	22
4.3 Exposición a la fuente radioactiva	24
4.4 Supervivencia	26
4.5 Inducción de SOS	26
5 RESULTADOS	28

6 DISCUSION	33
6.1 Supervivencia	33
6.2 Respuesta SOS	35
6.3 Modificaciones al modelo propuesto	38
6.4 Relevancia de las funciones SOS en <i>Escherichia coli</i>	41
7 Referencias	43
ANEXO I. Teoría del blanco	49
ANEXO II. Medios de cultivo y amortiguadores	53

Resumen

Entre las estrategias con que cuenta *Escherichia coli* para sobrevivir al daño genético se encuentra la respuesta SOS, que está integrada por un conjunto de genes involucrados en mecanismos de reparación o de tolerancia. Aún no se conoce con precisión el proceso que conduce a su activación, pero se sabe que el ADN de una banda induce dicha respuesta. Por el contrario se ha observado que las rupturas dobles no inducen directamente este sistema sino que se requiere una serie de pasos previos en donde pueden estar involucrados diferentes genes de recombinación. Al irradiar a diferentes cepas o bien al tratarlas con distintos mutágenos químicos, se notó que se requería la función de los genes **recO** y **recJ** que parecía relacionarse con la mayor o menor inducción de SOS. Se planteó así un modelo en el que la acción conjunta de los productos RecJ y RecO (este último como parte del complejo RecFOR) era necesaria para que las RDB pudieran servir de sustrato para la activación de las funciones SOS. El modelo postulaba que RecJ reconocería los extremos rotos y degradaría una de las cadenas creando así ADN de una sola banda. Para que RecA pueda unirse a este sustrato e inicie la respuesta SOS, sería necesaria la intervención del complejo RecFOR que al desplazar a la proteína SSB facilitaría la unión de la primera con el ADN.

Para confirmar o rectificar el modelo, se decidió exponer bacterias deficientes en genes de reparación o de protección a daño genético, a radiación alfa. En este caso la producción de radicales libres a consecuencia de la radiólisis del agua se concentra en sitios muy cercanos al lugar donde incide cada partícula y si esto ocurre cerca del ADN, la probabilidad de que tales radicales reaccionen con éste es bastante grande, lo que derivaría finalmente en más RDB ya sea por coincidencia de los daños o por la acción posterior de nucleasas. Como el modelo propuesto se inicia con la modificación de las RDB, se esperaba que la radiación alfa de alto LET al aumentar la cantidad de éstas amplificara la respuesta y así contar con más evidencias que confirmaran el modelo propuesto.

Los resultados indicaron que la protección conferida por el sistema **oxyR** así como la reparación de daño llevada a efecto por la enzima UvrABC, tienden a disminuir la cantidad de daño oxidante no letal, en tanto que el mecanismo en el que interviene **recB** es el principal responsable en la eliminación de rupturas de doble banda letales. Los genes **recO** y **recJ** por su parte, coadyuvan en la modificación de las lesiones, en especial las RDB, para dar paso a la activación de SOS. No obstante el mutante **recJ oxyR** pone de manifiesto la participación de **recJ**, en la reparación de bases oxidadas. Al respecto se plantea una hipótesis en cuanto a la forma como algunos de los genes estudiados promueven la activación del sistema SOS.

INTRODUCCION

1.1 Radiación

La importancia de la radiación radica en su capacidad para depositar energía en los átomos o las moléculas que atraviesa. Al hacerlo, dependiendo de la energía que posea o que deposite, puede provocar que los electrones orbitales vibren, que se exciten al pasar a niveles de energía superiores o bien que salgan de su órbita dando lugar a iones. A la radiación que tiene la capacidad de transferir la energía suficiente como para que ocurra esto último se le conoce como radiación ionizante.

La radiación ionizante puede ser de dos categorías: electromagnética (que incluye a los rayos X, gama y cósmicos) y corpuscular en la que se encuentran las partículas alfa, beta, protones, neutrones y fragmentos de fisión.

La primera categoría, que tiene gran poder de penetración, posee sólo energía en forma de fotones, abarca longitudes de onda de 10 \AA o menores y produce ionizaciones de manera muy dispersa. Según la magnitud de la energía, afecta a los materiales de acuerdo a tres distintos mecanismos que se conocen como efectos **a)** fotoeléctrico, **b)** Compton y **c)** formación de pares (figura 1). En el primer caso toda la energía del rayo se transfiere a un electrón de valencia, sacándolo de su órbita. En el segundo, parte de la energía se pierde por expulsión de un electrón de valencia y el resto continúa, también como radiación electromagnética pero desviándose de su trayectoria original y con menor energía. La tercera posibilidad se presenta con fotones de más alta energía que al pasar cerca del núcleo de un átomo son totalmente absorbidos por aquél, expulsando un positrón y un electrón.

La radiación ionizante corpuscular posee energía y masa pero tiene menor penetrabilidad y produce gran cantidad de ionizaciones a lo largo del limitado espacio que recorre. Un ejemplo de este tipo son las partículas alfa (α) que son núcleos de helio formados por dos protones y dos neutrones, lo que les da una doble carga positiva. 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 produciendo iones. Gran parte de los electrones expulsados (denominados rayos delta) tiene la

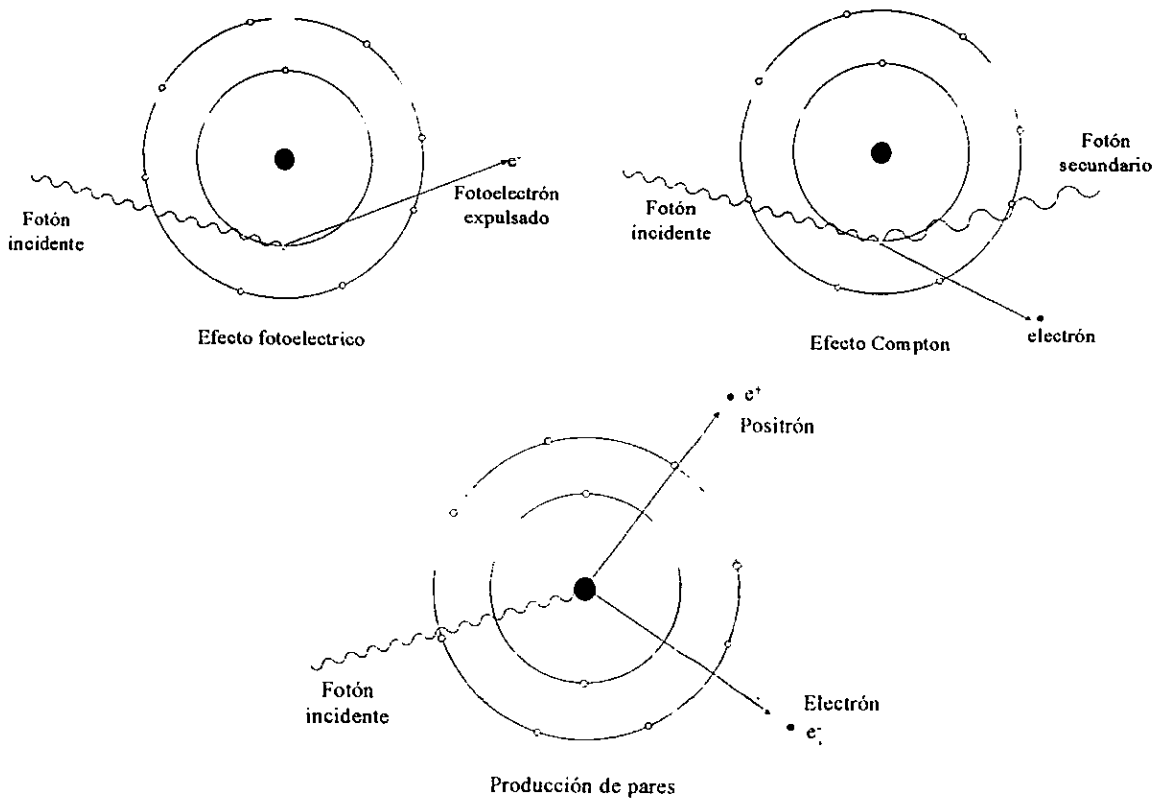


Figura 1. Ionización del material por radiación electromagnética (Casarett, 1968).

suficiente energía como para a su vez producir ionizaciones secundarias que se observan como ramificaciones a lo largo de la trayectoria de la partícula alfa, con lo que aumenta el alcance de la radiación (figura 2). Los rayos delta contribuyen aproximadamente con 25% del total de ionizaciones producidas por las partículas alfa. 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 hasta que finalmente captura dos electrones formando así un átomo de helio (Casarett, 1968).

Las radiaciones beta (β) son en realidad electrones provenientes del núcleo y según sea su carga positiva o negativa se denominan positrones o negatrones, respectivamente. Dado que las partículas β tienen sólo 1/7400 de la masa de las partículas α y viajan a una velocidad igual a la de la luz, es difícil que interactúen con los electrones orbitales, por lo que su penetración en la materia es mayor. Para que ocurra una ionización, deben transferirse por lo menos 32.5 eV por cada impacto de la partícula β con electrones orbitales. Una vez perdida toda la energía, el negatrón se incorpora como electrón orbital en un átomo positivo, mientras que el positrón interactúa con un electrón orbital, eliminándose mutuamente (Casarett, 1968; Arena, 1971).

Por carecer de carga los neutrones no ionizan directamente sino que al pasar por el material ceden energía cinética al núcleo de los átomos, ocasionando la liberación de una partícula cargada (un protón) capaz de producir ionizaciones. A medida que avanzan, los neutrones van perdiendo velocidad hasta que su energía cinética iguala a la de las moléculas del material que atraviesan. En este punto se conocen como neutrones térmicos y pueden ser atrapados por prácticamente cualquier núcleo atómico al que se acerquen, con la consecuente emisión de radiación gama.

Un parámetro para evaluar la capacidad de ionización de la radiación es la transferencia lineal de energía (LET), que se define como el promedio de energía cedida por unidad de distancia recorrida y se expresa como kiloelectrón volts por micrómetro (KeV/ μ). Por lo general, el LET de las radiaciones corpusculares es mucho más alto que el de la electromagnética. Esta característica es responsable de que la radiación corpuscular produzca muchas ionizaciones dentro de una zona restringida.

1.2 Efecto de la radiación sobre sistemas biológicos

Al incidir sobre las células, la radiación ionizante puede afectar, tanto a los componentes estructurales como al material genético. Los daños a los primeros son en general temporales, recuperándose o reponiéndose casi de inmediato al haber la posibilidad de sintetizar nuevas proteínas, en tanto que los segundos pueden ser temporales o permanentes. Si la célula es parte de

algún tejido somático las lesiones al genoma afectan solamente al individuo, pero si les sucede a los tejidos germinales los daños pueden propagarse a la descendencia.

1.3 Daño al ADN

La radiación afecta al material genético en función de dos alternativas conocidas como efectos directo e indirecto. El primero se refiere a la interacción de los fotones y/o partículas ionizantes con el ADN, mientras que el segundo se debe a reacciones con los radicales producidos por la radiólisis del agua en donde ocurre la mayoría de las ionizaciones, ya que es el componente más abundante de la materia viva. Los principales productos son iones hidroxilo (OH^{\cdot}), superóxido (HO_2^{\cdot}), hidronio (H^+) y por subsecuentes reacciones, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales libres como el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Casarett, 1968; Gentner y Paterson, 1984; Retel, 1993). Todas estas especies son muy reactivas y pueden atacar a cualquiera de los componentes del ADN.

El radical hidroxilo ataca enlaces dobles, especialmente el 5-6 de las pirimidinas para dar lugar a bases oxidadas como 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina, que es el aducto más frecuente (Téoule, 1987). En las purinas ocasiona la apertura del anillo de imidazol con formación de 4,6-diamino-5-formamidopirimidina o 2,6-diamino-4-hidroxy-5-formamidopirimidina en la mayoría de los casos (Friedberg, 1985; Téoule, 1987). Los radicales OH^{\cdot} reaccionan además con los carbonos de la desoxirribosa, sustrayendo un átomo de hidrogeno con formación de agua o rompiendo el enlace N-glucosídico, lo que genera sitios apurínicos o apirimidínicos (sitios AP). Todos estos cambios a su vez pueden finalmente dar lugar a rupturas del ADN. Las rupturas de banda sencilla (RBS) son interrupciones en la continuidad de una de las hebras de la molécula de ADN, casi siempre por la escisión del enlace éster fosfato-carbono 3'. Las de doble banda (RDB) se producen por la coincidencia de dos rupturas sencillas en hebras opuestas.

La radiación ionizante electromagnética (que como ya se mencionó produce ionizaciones de manera dispersa) da lugar a rupturas dobles a una frecuencia de solamente 5%, pero su

importancia biológica es mucho mayor pues son las principales responsables de la muerte celular. Con radiaciones de alto LET este porcentaje es mayor, ya que la gran cantidad de ionizaciones localizadas dentro de un área restringida, a su vez incrementa la probabilidad de coincidencia de lesiones entre cadenas opuestas (figura 2) (Ward, 1988; Goodhead, 1994).

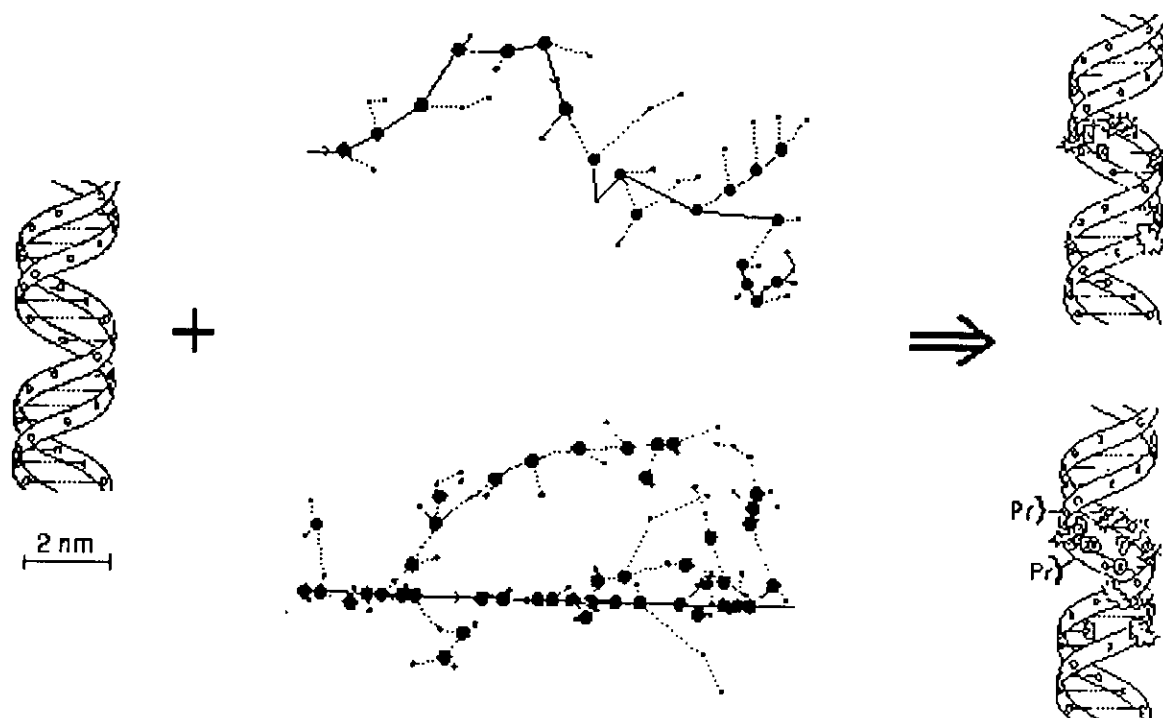


Figura 2. El esquema muestra el patrón de las ionizaciones a lo largo de la trayectoria de dos diferentes tipos de radiación. En la parte media superior se ve la trayectoria de un electrón de baja energía y en la inferior la de una partícula alfa. En las imágenes de la derecha se señalan algunas posibles lesiones al ADN (Goodhead, 1994).

1.4 Respuesta celular a la radiación



Figura 3. Esquema que muestra los diversos procesos que puede seguir la célula para proteger y conservar la información genética (ver texto). Mutation Research Forum (2000) 5(1)

En vista de que el funcionamiento de los organismos en buena medida depende de la integridad del material genético, gradualmente han desarrollado diferentes estrategias para enfrentar el ataque de agentes físicos y químicos de acuerdo con dos alternativas, la protección contra tales agentes o bien la reparación de las lesiones que aquellos causen en el genoma (Sancar y Sancar, 1988; Myles y Sancar, 1989). En la figura 3 se esquematizan algunos de estos procesos. Se observa que mientras algunas enzimas de protección como SOD (superóxido dismutasa) y CAT (catalasa) evitan que los “malosos” (los agentes oxidantes) dañen al ADN, otras reparan las lesiones, como es el caso de la enzima AGAT (alquil-guanina alquil transferasa) que retira alquilaciones sobre la guanina, o bien los sistemas REB/REN (reparación por escisión de bases o reparación por escisión de nucleótidos respectivamente).

Dentro de los mecanismos de protección, los más importantes son aquéllos englobados dentro del término conocido como respuesta de adaptación al estrés oxidante, que afecta no solamente al

genoma sino a todos los componentes celulares (Storz *et al.*, 1990). En cambio los sistemas de reparación solamente actúan sobre el material genético y poseen diferentes grados de especificidad.

Un ejemplo clásico de mecanismo de reparación específico es la fotorreactivación, proceso que realiza la enzima fotoliasa del ADN. Dicha enzima reconoce los dímeros de pirimidinas producidos por la luz ultravioleta y simplemente rompe los enlaces que se formaron entre los carbonos de dos pirimidinas adyacentes restaurando la estructura original del ADN (Friedberg, 1985). El grupo de eventos que comprende la reparación por escisión de tramos más o menos largos de ADN es menos específico, así como los mecanismos mediante los cuales se corrigen regiones mal apareadas ocurridas ya sea en el momento de la duplicación o bien durante la reparación de lesiones en el ADN.

Por último están las estrategias que implican reparación por intercambio de material genético (recombinación) o tolerancia temporal de las lesiones como es el caso de la respuesta SOS en las bacterias. Este último sistema sólo se activa ante daño genético y en él participan genes tanto de tolerancia como de reparación que en términos generales confieren mayores probabilidades de supervivencia. A continuación se explican más detalladamente algunos de estos mecanismos.

1.5 Respuesta de adaptación al estrés oxidante

Los organismos que obtienen energía a través de oxígeno molecular poseen sistemas de protección a radicales oxidantes como el anión superóxido, el radical hidroxilo o el peróxido de hidrógeno que se generan por reducción incompleta del oxígeno durante el proceso respiratorio. Estos sistemas funcionan en forma continua pero cuando por alguna razón (que entre otras puede ser la exposición a la radiación) la cantidad de agentes oxidantes es excesiva, aumentan su actividad elevando los niveles de diversas enzimas que participan en la resistencia celular a tales agentes. En la bacteria *Escherichia coli* se incrementa la expresión de por lo menos 40 genes, que a su vez forman parte de tres grandes sistemas o regulones controlados positivamente por los genes *oxyR*, *soxR* y *katF* (también conocido como *rpoS*)

respectivamente (Demple, 1991; Kato *et al.*, 1994; Loewen y Hengge-Aronis, 1994). Dentro del primer regulón (*OxyR*) se encuentran genes que solamente participan en la protección de la célula contra peróxidos, mientras que en los otros dos (*SoxR* y *KatF*) hay además genes de reparación. Cabe mencionar que algunos genes participan en más de una de estas vías.

El sistema OxyR estabiliza el nivel endógeno de peróxido de hidrógeno. El gen *oxyR* regula la transcripción de al menos 9 genes entre los que se conoce a *katG*, que codifica para la catalasa-hidroperoxidasa I (HPI); *ahpCF*, la alquil-hidroperóxido reductasa o *gorA*, a la l-glutation reductasa (González-Flecha y Demple, 1997; Zheng *et al.*, 1998). Cuando se requiere disminuir el exceso de H₂O₂ se activa OxyR por formación de un enlace disulfuro intramolecular entre las cisteínas 199 y 208, promoviendo así la transcripción de los demás genes de la vía. A la inversa, OxyR se inactiva por la reducción del enlace disulfuro, que es a su vez catalizada por la enzima glutaredoxina, que forma parte del mismo regulón (Loewen *et al.*, 1985; Zheng *et al.*, 1998; Åslund *et al.*, 1999; Michán *et al.*, 1999).

El sistema SoxR por su parte, controla alrededor de 15 genes y responde a los iones superóxido (Demple, 1999). La activación de este regulón ocurre cuando el factor de transcripción SoxR se oxida al desensamblarse el centro 2Fe-2S, iniciando así la expresión de *soxS* que a su vez aumenta los niveles de transcripción de los demás genes incluidos en el regulón. Aquí se han identificado genes antioxidantes, como las superóxido dismutasas, de reparación, como la endonucleasa IV, o bien otros que participan en el ciclo de Krebs, como el gen de la fumarasa (Demple, 1994; Demple, 1999; González-Flecha y Demple, 2000; Touati, 2000).

La proteína codificada por *katF* (también conocido como *rpoS*) es un factor de transcripción σ^s que regula la expresión de alrededor de 50 genes involucrados en respuestas a diferentes tipos de estrés, incluyendo al choque térmico, al producido por descenso en el pH ó por carencia de nutrientes, y al estrés oxidante. Por lo general, el control de *rpoS* se ejerce positivamente, si bien hay algunos casos en los que ocurre en forma negativa (Loewen *et al.*,

1998). La activación del sistema *rpoS* está a su vez regulada por diferentes factores entre los que se encuentra *oxyS*. Se ha comprobado que la traducción del mensaje de *rpoS* está regulada por el ARN mensajero de *oxyS* a través de la unión de este último con la proteína Hfq (Zhang *et al.*, 1998). Todavía no se ha llegado a identificar a todos los productos de los genes que controla *katF*, sin embargo se sabe que incrementan la probabilidad de supervivencia en medio mínimo, protegen contra el daño al material genético y promueven cambios morfológicos en la célula, así como una mayor tolerancia a los incrementos en la temperatura (Loewen y Hengge-Aronis, 1994). Algunos genes del regulón son por ejemplo, *katE* y *xthA* que codifican para la catalasa HPII y la exonucleasa III respectivamente. (Ivanova *et al.*, 1994; Eisenstark *et al.*, 1996; Jamieson y Storz, 1997). En un principio se consideraba que el sistema sólo se activaba durante la fase estacionaria de crecimiento, pero recientemente se ha comprobado que también funciona como un regulador global ante diversas situaciones de estrés (Hengge-Aronis, 1996).

1.6 Reparación por escisión

Como ya antes se mencionó, la reparación por escisión implica el corte y la eliminación de la o las regiones de ADN que contengan daños, vía eliminación de bases (REB) o bien de tramos que incluyen un número determinado de nucleótidos (REN).

El primero (figura 4) se inicia con la hidrólisis del enlace N-glucosídico de la base dañada, con lo que queda un hueco apurínico o apirimidínico (sitio AP), al que reconocen enzimas, por lo mismo llamadas endonucleasas AP, que al romper el enlace éster fosfato, ya sea por hidrólisis o por eliminación β , dejan una ruptura en la hebra de ADN que posteriormente reparará una polimerasa. Una característica importante de este tipo de reparación es su relativa especificidad, ya que las diferentes enzimas que participan en este mecanismo reconocen solamente cierto tipo de bases dañadas (Glassner *et al.*, 1998).

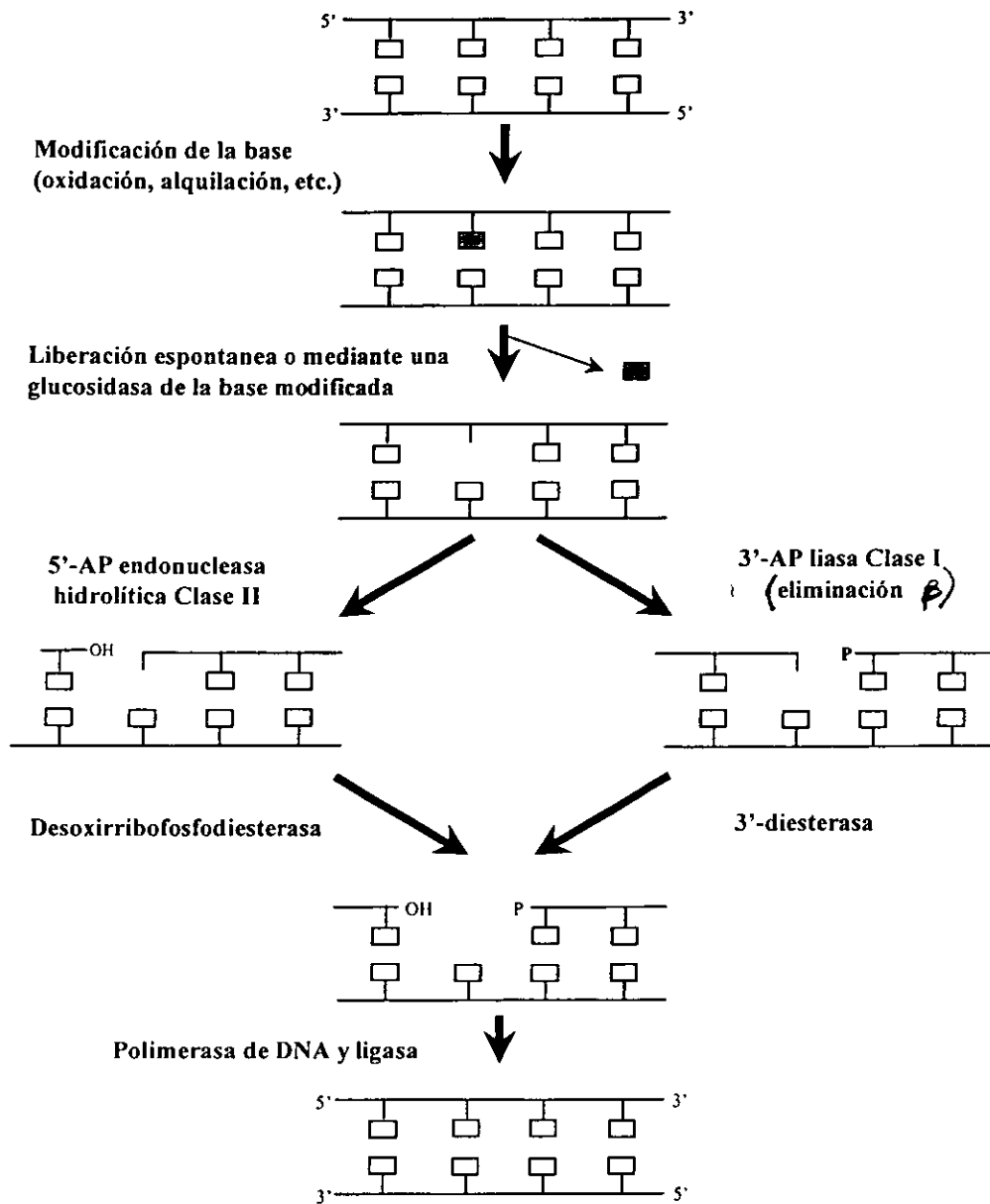


Figura 4. Esquema de las dos alternativas para la reparación por escisión de bases (Glassner *et al.*, 1998)

El proceso REN implica la liberación de los tramos de ADN de una sola banda que contienen el daño. Es la principal respuesta celular a modificaciones al ADN causadas por agentes muy diversos y por lo mismo puede reconocer una amplia gama de lesiones. Los pasos del proceso son: 1) reconocimiento de la lesión, 2) corte a ambos lados de ésta y 3) separación del tramo que contiene a la lesión (Bhatia *et al.*, 1996). En *E. coli* todos ellos están a cargo de la escinucleasa

ABC, también conocida como UvrABC, que consta de tres subunidades. La subunidad A forma un dímero con gran afinidad por el ADN dañado que se adhiere a lugares donde hay alguna alteración. A esto se une la subunidad B que al formar un complejo UvrB-ADN provoca el desprendimiento de UvrA. Al complejo UvrB-ADN se une UvrC que se encarga de romper los enlaces fosfodiéster a ambos lados de la región alterada y por acción de la helicasa UvrD, se libera entonces el oligonucleótido correspondiente (figura 5). Los huecos resultantes de cualquiera de las dos alternativas antes descritas (REB ó REN) son posteriormente resintetizados por la polimerasa I de ADN (Lin y Sancar, 1992).

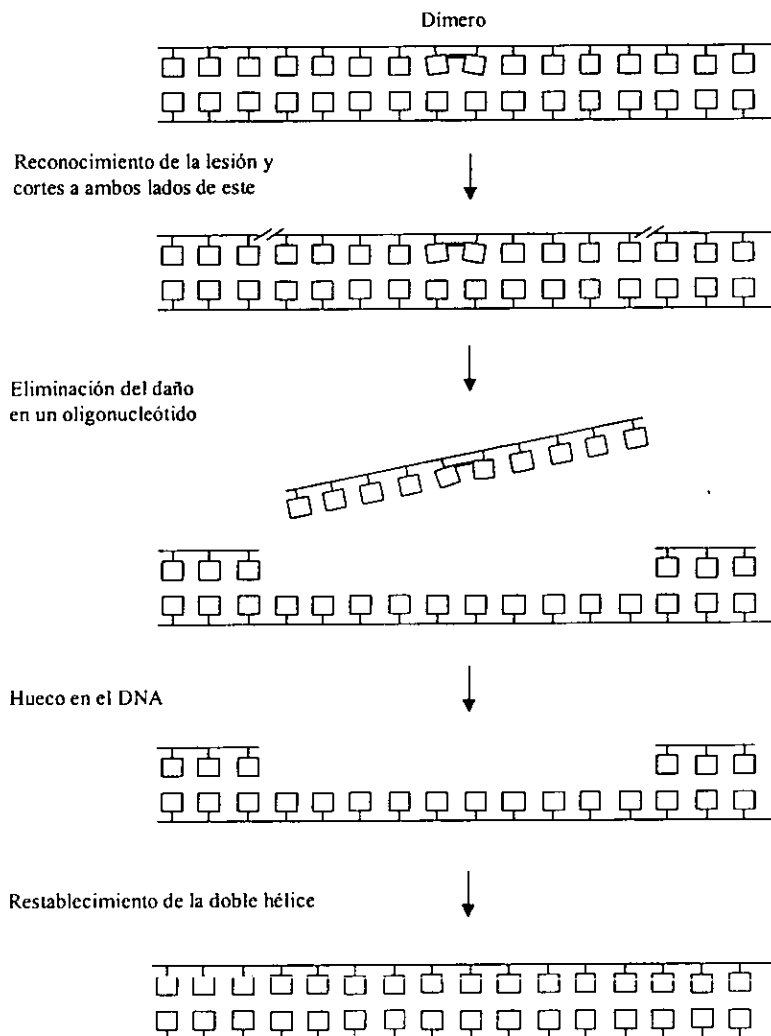


Figura 5. Modelo de reparación por escisión de nucleótidos (Friedberg, 1985)

1.7 Reparación por recombinación

El fenómeno de recombinación se presenta en todos los organismos tanto haploides como diploides y su único requisito es que haya al menos dos copias de ADN. En esencia el proceso se refiere al paso de la hebra de una molécula de ADN a otra diferente, ya sea en forma recíproca, es decir que haya intercambio entre las dos, o no recíproca, en donde solamente una de ellas recibe nuevo material.

El primer modelo de recombinación fue propuesto hace cerca de cuarenta años por Holliday (1964) para explicar los patrones de conversión genética en *Ustilago maydis*. En *E. coli*, el proceso consiste en la apertura y desnaturalización parcial del ADN por acción de una enzima que al llegar a una secuencia específica, corta una de las bandas dejando así un extremo libre 3'-OH. Este se alarga al seguir separándose las dos cadenas y con la ayuda de dos proteínas, RecA y SSB (por las siglas en inglés "single strand binding"), se traslada hasta donde está la otra copia de ADN, apareándose entonces con su secuencia homóloga. De este modo cada molécula queda con un tramo de la otra (revisado en Kowalczykowski y Eggleston, 1994).

Los eventos de recombinación genética en bacterias cumplen dos objetivos importantes, introducir variabilidad genética a través de procesos como conjugación, transducción o transformación o bien como alternativa en la reparación de daños, principalmente rupturas dobles causadas no solamente por la acción de la radiación u otros agentes sino también de aquellas que ocurren durante el proceso normal de duplicación del ADN (Cox, 1998).

Cuando la polimerasa que cataliza la síntesis del ADN nuevo encuentra una lesión ilegible (dímero, aducto, etc.), interrumpe el proceso y prosigue varios nucleótidos más adelante, dejando un hueco enfrente del sitio donde se halla el daño. Para resolver este problema la célula lleva a cabo un evento de recombinación no recíproca, en el que una molécula homóloga de ADN cede el fragmento homólogo para así rellenar el hueco que quedó en el ADN recién sintetizado, evitando así la fragmentación del material genético (Smith, 1989, Cox, 1998; Kuzminov, 1999).

En el caso de rupturas dobles la recombinación es la única posibilidad de reparación, ya que al perderse la continuidad de la hebra de ADN no hay un molde a partir del cual pueda ser resintetizada.

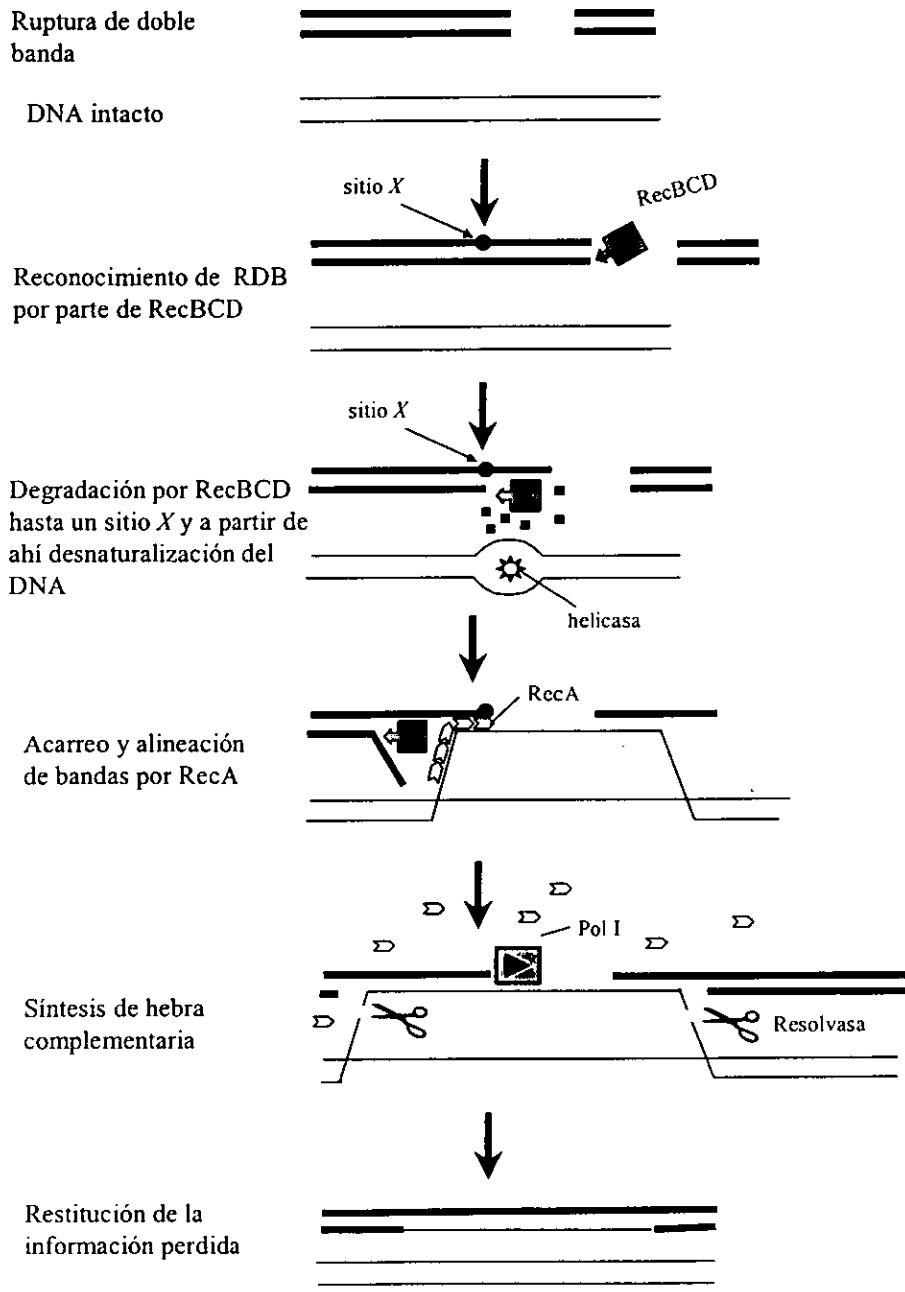


Figura 6. Mecanismo de reparación por recombinación

La enzima RecBCD es la que reconoce los extremos rotos del ADN y los degrada en dirección 3'-5' hasta encontrar una secuencia específica denominada sitio *ji* (X), en donde se separa la subunidad RecD y RecBC funciona entonces como helicasa que separa ambas bandas de ADN, promoviendo al mismo tiempo la polimerización de RecA sobre una de las dos. Esta proteína por su parte, se encarga de intercambiar dicha banda con su secuencia homóloga en una molécula intacta, mientras que la parte faltante es sintetizada por la polimerasa I del ADN (figura 6).

1.8 Reparación de disparidades en las bases

Además de los mecanismos ya mencionados, la bacteria cuenta con otros cuyo objetivo es eliminar disparidades que quedaron al finalizar los procesos de duplicación o de reparación del ADN, y asegurar así que la información genética se conserve fielmente. La actividad correctora de las polimerasas es uno de esos mecanismos y reside en la función nucleasa 3'-5', simultánea al proceso de polimerización. Aún así es posible que a dicha actividad de edición se lleguen a escapar bases o regiones mal apareadas, por lo que se cuenta con una alternativa más, la llamada en inglés "methyl-directed mismatch repair" que puede traducirse como reparación de disparidades determinada por metilaciones. El proceso consiste en retirar el tramo de la banda donde se encuentra(n) la(s) disparidad(es) para después ser resintetizado en la forma correcta. Se requiere cumplir con dos condiciones: **1)** reconocimiento de cualquiera de los ocho posibles apareamientos erróneos o de las estructuras en forma de asa que resulten de pérdidas o inserciones de bases y **2)** selección y eliminación del tramo incorrecto, utilizando como guía la presencia de metilaciones periódicas a lo largo de la hebra que sirve de molde durante la síntesis (Modrich, 1991)

Las encargadas de llevar a cabo este proceso en *E. coli* son las proteínas MutS, MutL y MutH. (Modrich, 1991; Yang, 2000). Cada vez que finaliza un evento de duplicación, la proteína Dam introduce un grupo metilo en el nitrógeno 6 de cada adenina que se localice en la secuencia GATC, marcando al material genético como propio para así diferenciarlo del de otra(s) especie(s) que llegase a penetrar a la célula. A la siguiente duplicación, el ADN ya metilado

sirve de molde para la síntesis de cadenas nuevas que permanecen temporalmente sin metilar. A éstas se pega MutS que reconoce a las bases erróneas y las regiones de ADN con pérdidas o inserciones extra, (Parker y Marinus, 1992). A continuación se agrega MutL y por último MutH, una endonucleasa que sólo se activa cuando se une a MutS. Por su parte, MutL ayuda a establecer la unión entre ambas proteínas. Ya formado el complejo de todas estas proteínas con el ADN, se realizan cortes en las dos secuencias GATC que queden a ambos lados del error y por acción conjunta de una helicasa y alguna exonucleasa, que puede ser RecJ (Harris *et al.*, 1998), se retira el tramo erróneo de ADN. Más adelante, la polimerasa I lo resintetiza, la ligasa restaura los enlaces fosfodiéster y finalmente Dam metila el ADN ya reparado (figura 7). Se ha comprobado que además de su papel de “retocado” al finalizar la duplicación, este sistema también corrige regiones con secuencias diferentes (*heteroduplexes*), resultado de errores en la recombinación genética (Zarht y Maloy, 1997).

Además de Dam, existen otros sistemas para el marcaje específico del material genético como es el de restricción/modificación *hsdRMS* (Fuller-Pace y Murray, 1986) de *E. coli*, y otros más que no se describen en detalle por no participar en este proceso de corrección.

1.9 Sistema SOS

En *E. coli* existen diversos sistemas de reparación o de tolerancia que incrementan las posibilidades de sobrevivir al daño genético. Una de tales estrategias es la respuesta SOS, cuya existencia que fue propuesta originalmente por Defais *et al.* (1971) y desarrollada posteriormente por Radman (1974) Dicha respuesta está formada por alrededor de 30 genes (Courcelle *et al.*, 2001) que tienen que ver con mecanismos de reparación y/o tolerancia a daño genético y que confiere a la célula mayores posibilidades de supervivencia ante alguna situación adversa. A este fenómeno se le llamó SOS (por la señal internacional de auxilio “Save Our Souls”) ya que se pensó que se trataba de la última posibilidad de las células para sobrevivir (Radman, 1974; para revisión ver Friedberg *et al.*, 1995). La activación de SOS depende de los genes, *lexA* y *recA*. En circunstancias normales el producto de LexA permanece unido a la secuencia de 17 bases común a todos los operadores SOS, bloqueando así

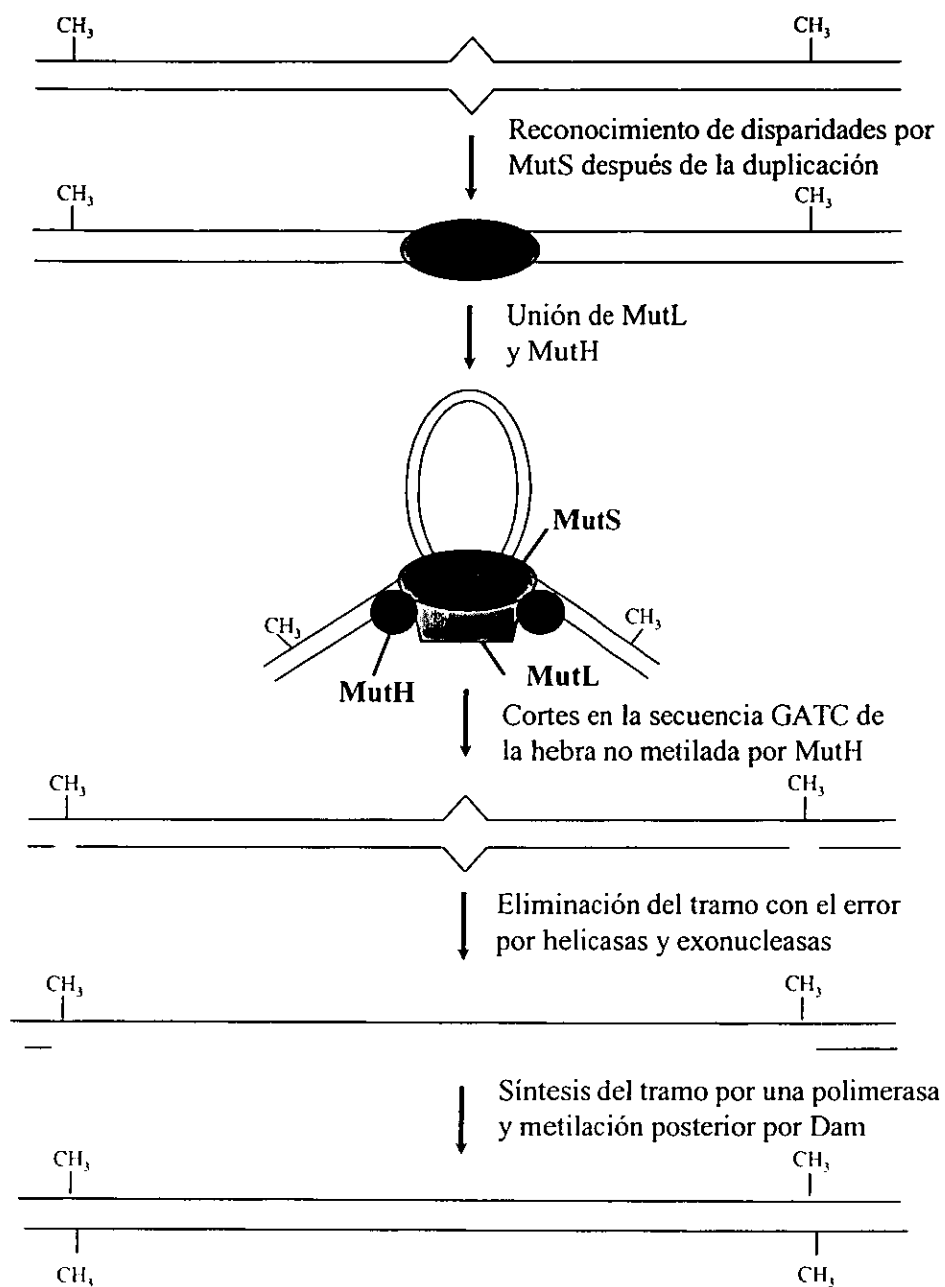


Figura 7. Modelo de la reparación de disparidades (Modrich, 1991)

a la transcripción. Al ocurrir lesiones en el ADN se producen regiones de una sola hebra (Sassanfar y Roberts, 1990) que activan o modifican al producto del segundo, la proteína RecA, que actúa entonces como co-proteasa y promueve la autodegradación de LexA (Little, 1984) para que se inicie la transcripción de todos los demás, incluyendo a *recA* y *lexA* mismos. El tiempo, la duración y el nivel de inducción varían para cada gen, dependiendo de la localización y el grado de afinidad de la secuencia a la que se une LexA. Gracias a esta característica algunos genes pueden estar parcialmente inducidos, debido por ejemplo a lesiones espontáneas en el ADN, mientras que otros requieren que haya una gran cantidad de daño para llegar a activarse (Walker, 1987; Friedberg *et al.*, 1995; Courcelle *et al.*, 2001). Una vez eliminado el daño se pierde la señal de inducción, RecA regresa a su estado original y LexA se une nuevamente a los operadores, desactivando así a todo sistema (figura 7).

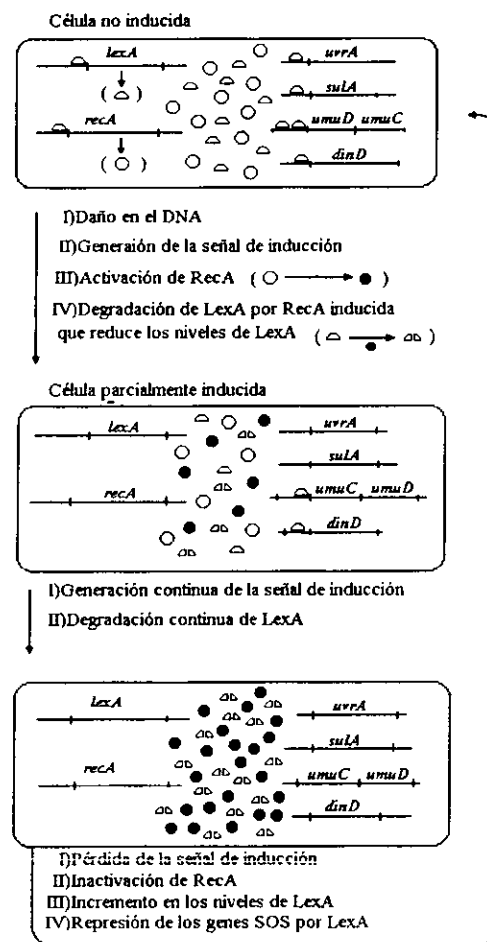


Figura 8. Regulación del sistema SOS (Walker, 1987)

2 ANTECEDENTES

En un principio se consideraba que la ocurrencia de lesiones en el ADN era suficiente para activar la respuesta SOS, sin embargo difícilmente podría un sólo sistema reconocer toda la gama de daños que puede producirse por la acción de diversos agentes. En este sentido cabe suponer que debe haber una estructura común a la que finalmente desemboquen las diferentes lesiones. Aun no se conoce con precisión lo que conduce a la activación de SOS, pero hay bastantes evidencias de que son los huecos o regiones de una banda en el ADN (producidos en su mayoría por la existencia de lesiones que bloquean a la polimerasa durante el proceso de la duplicación) que al ser reconocidos por RecA inducen al sistema (Sassanfar y Roberts, 1990; Kuzminov, 1996; Cox, 1998; Courcelle *et al.*, 2001). En el caso de las rupturas dobles al parecer se requiere de una serie de pasos previos en donde están involucrados diferentes genes de recombinación, como son *recO* y *recJ* (Umezú y Kolodner, 1993; Hedge *et al.*, 1995; Whitby y Lloyd, 1995). Breña, Serment (1998) y Suárez (1997) al irradiar a diferentes cepas de *E. coli* o bien al tratarlas con distintos mutágenos químicos observaron que se requería la función de *recO* y *recJ*, cuya actividad parecía relacionarse con la mayor o menor activación de SOS.

Para explicar lo anterior se planteó un modelo en el que la acción conjunta de RecJ y RecO (este último como parte de un complejo RecFOR) era necesaria para que las rupturas de doble banda pudieran servir de sustrato en la activación de las funciones SOS. El modelo postulaba que la nucleasa RecJ reconocería los extremos rotos y degradaría una de las dos cadenas creando de este modo ADN de una sola banda. Ambas proteínas, RecA y SSB tienen gran afinidad por este tipo de estructura (Umezú y Kolodner, 1994) y para que la primera pueda unirse a este sustrato e iniciar la respuesta SOS, sería necesaria la intervención del complejo RecFOR que al desplazar a SSB facilitaría la unión de RecA con el ADN (Umezú y Kolodner, 1994).

Para aportar más argumentos que confirmaran o rectificaran el modelo, se decidió exponer bacterias deficientes en genes de reparación o de protección a daño genético a la radiación alfa.

En este caso la producción de radicales libres a consecuencia de la radiólisis del agua se concentra en sitios muy cercanos al lugar donde incide cada partícula y si esto ocurre cerca del ADN, la probabilidad de que tales radicales reaccionen con éste es bastante grande, lo que derivaría finalmente en más rupturas de doble banda (Goodhead, 1994) ya sea por coincidencia de los daños o por la acción posterior de endonucleasas (Sutherland *et al.*, 2000). Como el modelo propuesto se inicia con la modificación de las rupturas de doble banda, el hecho de que la radiación de alto LET cause mayor cantidad de RDB que la radiación electromagnética, amplificaría la respuesta lo que a su vez permitiría confirmar o rectificar el modelo propuesto.

3 OBJETIVOS

1. Evaluar el daño producido al exponer cepas de *E. coli* con diferentes capacidades de reparación a una fuente natural de partículas alfa.
2. Observar la participación de diferentes genes en la reparación de lesiones producidas por partículas alfa.
3. Observar la participación de diversos genes en el procesamiento de lesiones que conduzcan a la inducción de las funciones SOS.
4. Comparar los efectos de las partículas alfa con los de la radiación gama.

4 MATERIAL Y METÓDOS

4.1 Aislamiento de mutantes sensibles a tetraciclina

Para contar con el material biológico necesario se construyeron cepas de *E. coli* con mutaciones en diferentes genes de reparación, protección y/o recombinación pero además que tuvieran los marcadores necesarios para poder medir el grado de actividad de las funciones SOS. Esto se realizó transfiriendo genes defectuosos de unas cepas a otra, tomando en cuenta que tales genes llevan el marcador de resistencia a tetraciclina.

El primer paso consistió en el aislamiento de mutantes espontáneas sensibles a dicho antibiótico a partir de la variante receptora PQ30 (Maloy y Nunn, 1981). Se tomó una colonia aislada, se suspendió en caldo de Luria-Bertini (anexo II) y se incubó a 37 °C, con agitación constante hasta alcanzar la fase estacionaria (16-20 horas). Este cultivo se sembró en cajas de Petri con medio selectivo (anexo II) y se incubó a 37 °C por 48 horas. La resistencia a dicho antibiótico se debe a alteraciones que reducen la permeabilidad de la membrana al compuesto, pero que a la vez incrementan la sensibilidad a otros agentes tóxicos como el ácido fusárico. El calentamiento por autoclave desnaturaliza a la clorotetraciclina que pierde toxicidad pero no su capacidad de promover las modificaciones en la membrana de las células resistentes al antibiótico (Tc'). Por esta razón, al sembrar el cultivo en medio con el bactericida (ácido fusárico) solamente crecerán las bacterias sensibles a tetraciclina (Ames *et al.*, 1985). Pasadas las 48 horas de incubación se recuperaron las colonias, se purificaron, se comprobó su sensibilidad a tetraciclina y a partir de ellas se construyeron por transducción las nuevas cepas usando como donadoras a aquéllas en las que alguno de sus genes fue desactivado por la inserción del transposón Tn10, que confiere resistencia a tetraciclina.

4.2 Transducción

La transducción general mediante el fago P1 (Miller, 1972) tiene la particularidad de poder acarrear cualquier gen perteneciente a la bacteria en que se haya introducido el virus. Al final de la

lisis, ya cuando se degrada el ADN bacteriano al tiempo que se "empaca" el del fago dentro de su envoltura proteica, pueden introducirse trozos de dicho ADN con una longitud similar a la del genoma del fago. Se forman así las llamadas partículas transductantes que aun cuando no lleven ADN del virus, conservan la capacidad de infección. De este modo el fragmento de ADN bacteriano puede integrarse por recombinación, con su secuencia homóloga al nuevo hospedero.

Los transductantes se eligieron exponiéndolos al agente genotóxico mitomicina C (MMC), un agente alquilante bifuncional que produce enlaces interbanda en el ADN y que pone en evidencia deficiencias en los mecanismos de reparación. Además de las que ya se tenían, se construyeron dos cepas más, una con un defecto en el gen *recB* y otra en el gen *recD*.

Una vez purificada la variante sensible a tetraciclina, se infectó con un lisado de AQ5931 (*recB::Tn10*) y se sembró en medio sólido de Luria con ampicilina (20 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml). Al día siguiente se recuperaron las colonias resultantes y se probó su resistencia a MMC. Se seleccionaron y purificaron aquellas colonias que mostraran una respuesta similar a la cepa progenitora. Para comprobar si la síntesis de β-galactosidasa dependía de la inducción de SOS, se midió la degradación de lactosa en cultivos en fase logarítmica (2×10^8 cél/ml) de los transductantes seleccionados, previamente expuestos a un agente genotóxico conocido. Para cada caso se preparó una serie de cuatro tubos de la siguiente manera:

- Tubo 1. Cultivo bacteriano
- Tubo 2. Cultivo +lactosa (2%)
- Tubo 3. Cultivo +MMC (0.8 µg/ml)
- Tubo 4. Cultivo +lactosa +MMC

Cada serie se incubó a 37 °C por 16 horas y pasado este tiempo se agregaron unas gotas de azul de bromotimol observándose la coloración en cada tubo. El primer paso en la degradación de la lactosa está a cargo de la β-galactosidasa y como producto del metabolismo se llega a ácido láctico que baja el pH del medio y ocasiona un cambio a color amarillo al agregar azul de bromotimol al medio de cultivo. De acuerdo con lo anterior, se seleccionaron aquellos transductantes que presentaran color amarillo únicamente en el tubo que contenía lactosa y

MMC ya que esto indicaba que la acidificación del medio dependía de la degradación de lactosa por β -galactosidasa y que esta última dependía a su vez de la inducción de SOS.

Además se verificó la síntesis constitutiva de fosfatasa alcalina sembrando los transductantes en medio sólido LB para que crecieran colonias aisladas. Sobre éstas se colocó un trozo de papel filtro empapado con el substrato específico para dicha enzima (PNPP) que al degradarse libera un compuesto de color amarillo. Si el papel filtro se ponía amarillo al contacto con las colonias, significaba que la enzima se producía en forma continua.

La tabla I presenta las cepas que se utilizaron a lo largo de todo el trabajo.

Tabla I.

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
PQ30	<i>F⁻, thr, leu, his, pyrD, thi, trp::MuC', srl::Tn10, rpoB, sfiA::MuD(Ap lacZ), cts, lac ΔU169, galE, galY, phoC.</i>	Quillardet & Hofnung (1985)
PQ33	Igual a PQ30 pero <i>uvrA</i>	ibid. (1985)
OG100	Igual a PQ30 pero <i>ΔoxyR, htuB</i> y sin Tn10.	Goerlich <i>et al.</i> (1989)
IN602	Igual a PQ30 pero <i>zga::Tn10, recB.</i>	Este trabajo
IN99	Igual a OG100 pero <i>zga::Tn10, recB.</i>	Breña <i>et al.</i> (1998)
IN164	Igual a OG100 pero <i>recJ::Tn10.</i>	ibid. (1998)
IN237	Igual a PQ30 pero <i>recO::Tn5.</i>	ibid. (1998)
IN400	Igual a PQ30 pero <i>recJ::Tn10</i>	ibid. (1998)

4.3 Exposición a la fuente radioactiva

De acuerdo a la metodología anteriormente reportada (Breña *et al.*, 1996), a partir de cultivos en medio sólido se sembró una colonia en caldo LB con el antibiótico adecuado y se incubó a 37° C con agitación constante durante 16-20 horas. El cultivo se diluyó 1:50 en LB y se incubó hasta alcanzar una concentración de 2×10^8 cél./ml. Nuevamente se diluyó, pero esta vez 1:25 y en solución amortiguadora de fosfatos pH 7 para obtener una concentración final de 2×10^6 cél./ml. Para cada dosis se tomaron 5 ml de esta suspensión y se pasaron a través de una membrana de 13 mm, eliminando la mayor cantidad posible de líquido. Se midió el diámetro

del empaque del dispositivo de filtración para calcular el área en la que quedarían depositadas las bacterias y de acuerdo con su tamaño, saber cuántas se necesitaban para ocupar toda esa superficie. Se concluyó que 4×10^7 bacterias formarían una capa considerando a cada célula como un cilindro de $1 \mu\text{m}$ de diámetro por $2 \mu\text{m}$ de altura. Lo anterior se corroboró por microscopía electrónica de barrido (figura 9).

Cada membrana se colocó sobre un disco de papel filtro Whatman N° 3 empapado en amortiguador de fosfatos, dentro de una placa con cuatro pozos y se expuso a un emisor de partículas alfa a intervalos de 5 hasta 240 minutos. Se utilizó una fuente de americio (Am_{241}) cuya actividad de $100 \mu\text{Ci}$ equivale a 3.7×10^6 desintegraciones por segundo. Los cálculos de dosis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Trazas del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (Pérez, 2001). Pasada la exposición se recuperó cada membrana, se introdujo dentro de un tubo de ensaye con 2 ml de LB y se agitó vigorosamente por 20 segundos para que se desprendieran todas las bacterias.

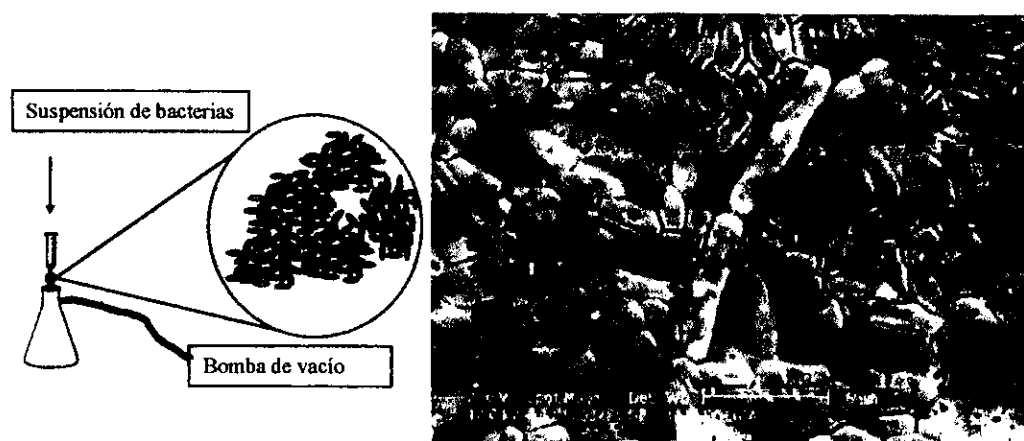


Figura 9. Dispositivo de filtración y aspecto de la capa de bacterias sobre el filtro de policarbonato

Para determinar el grado de recuperación de bacterias, se realizaron pruebas con diferentes tipos de filtros, variando además el sistema de filtración, el tiempo de permanencia de las células sobre la membrana o el tiempo de agitación de la membrana dentro del tubo y

sembrando en medio sólido para determinar la cantidad de colonias. Se concluyó que utilizando filtros de policarbonato con poro de 0.2 μm , matraz Kitasato en lugar de jeringas y agitación con vortex por 20 segundos, se lograba recuperar el 100% de la fracción celular.

4.4 Supervivencia

En microorganismos se considera a la supervivencia como la capacidad de cada célula de reproducirse y formar una colonia visible en el medio de cultivo adecuado. Una vez desprendidas las bacterias de la membrana, se tomó una alícuota, se diluyó en amortiguador de fosfatos, se sembró en medio LB y se incubó a 37 °C por 24 horas. Pasado este tiempo se contó el número de colonias en cada caja y se calculó el porcentaje de supervivencia para cada dosis tomando como el 100% a la cantidad del testigo.

4.5 Inducción de SOS

Para efectuar los cromosayos, se incubó el resto de la suspensión durante una hora a 37 °C, en baño María con agitación constante. A continuación se agregaron tres gotas de cloroformo para romper la pared celular, se tomaron 0.3 ml y se repartieron en tubos con 2.7 ml de los amortiguadores específicos (PO_4 0.1 M pH 7 para β -galactosidasa o Tris 1 M pH 8.8 para fosfatasa alcalina) (ver anexo II). Se añadieron 0.5 ml de cada uno de los sustratos específicos para cada enzima (*o*-nitrofenil-galactopiranososa para β -galactosidasa y *p*-nitrofenil-fosfato para fosfatasa alcalina). Se incubaron a 37 °C hasta que se desarrolló un color amarillo y se midió por espectrofotometría a 420 nm. La determinación de SOS se basa en la intensidad de dicha coloración que es a su vez función del grado de actividad de ambas enzimas y cuya relación (factor R) se obtiene de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{FR} = \frac{A_{420} \beta\text{-gal} \times t\text{-alc}}{A_{420} f\text{-alc} \times t\beta\text{-gal}}$$

donde:

FR= Factor R
 A_{420} = Absorbencia a 420 nm
 β -gal = β -galactosidasa
 f -alc = fosfatasa alcalina
t = tiempo de reacción de cada enzima

El factor o grado de inducción de SOS (FI), se calcula al comparar los FR de las muestras tratadas con el del testigo

$$FI = \frac{FR_t}{FR_0}$$

donde:

FR_t = Actividad SOS en irradiados
 FR_0 = Actividad SOS en testigo sin irradiar

Finalmente se calcula la potencia de inductora de SOS (SOSpi) definido como la pendiente de la curva en la región en que la relación dosis respuesta es lineal (Quillardet y Hofnung, 1985).

5 RESULTADOS

La figura 10 muestra la supervivencia de las distintas cepas de *E. coli* expuestas a dosis crecientes de radiación α . Con excepción de dos, en todas ellas se aprecian dos pendientes la primera de tipo lineal que va de 0 a 112Gy, muy cercana a la DL_{37} (definida como la dosis a la que sobrevive el 37% de la población inicial) y a partir de este punto la segunda, que es exponencial. Desde el inicio las cepas IN99 e IN602 presentan una caída exponencial pues ambas son deficientes en el gen *recB* por lo que cada ruptura representa un evento letal.

Tabla II. Valores de DL_{37} , de pendiente y porcentaje de supervivencia a la dosis más alta*. En el intervalo de 0 a 112 la respuesta aun es lineal, mientras que de 112 a 336 la relación es logarítmica.

Cepa	DL_{37}	Pendiente		Porcentaje de supervivencia a 336 Gy
		0-112 Gy	112-336 Gy	
PQ30 <i>wt</i>	131.24	-0.4691	0.01284	2.60
PQ33 <i>uvrA</i>	117.46	-0.5406	0.01243	2.40
IN237 <i>recO</i>	113.00	-0.5540	0.01434	2.00
IN400 <i>recI</i>	88.79	-0.6350	0.01295	2.00
IN602 <i>recB</i>	37.04	0.2684	0.02684	0.04
OG100 <i>oxyR</i>	95.48	-0.6142	0.01686	0.70
IN164 <i>oxyR recI</i>	86.62	-0.6440	0.02065	0.30
IN99 <i>oxyR recB</i>	37.04	0.02713	0.02713	0.04

En IN602 e IN99 este último se extrapoló de acuerdo con la pendiente, ya que debido al número limitado de bacterias que se requería para los ensayos, a la dosis más alta ya no sobrevivía ninguna colonia.

En la tabla II se muestran las DL_{37} , las pendientes y los porcentajes de supervivencia a la dosis más alta, para cada una de las cepas. Se observa que a partir de 112 Gy tanto OG100 como IN164, presentan pendientes más pronunciadas que las del grupo más resistente.

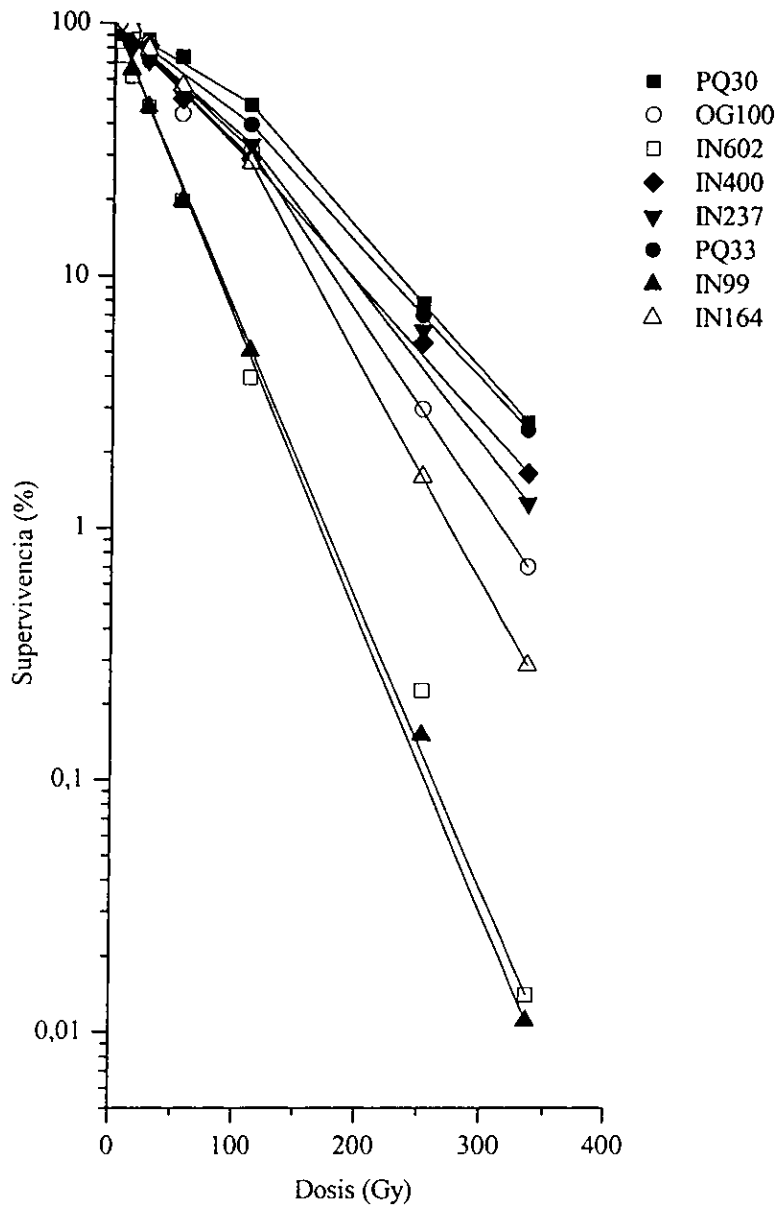


Figura 10. Supervivencia de las diferentes cepas a las partículas alfa

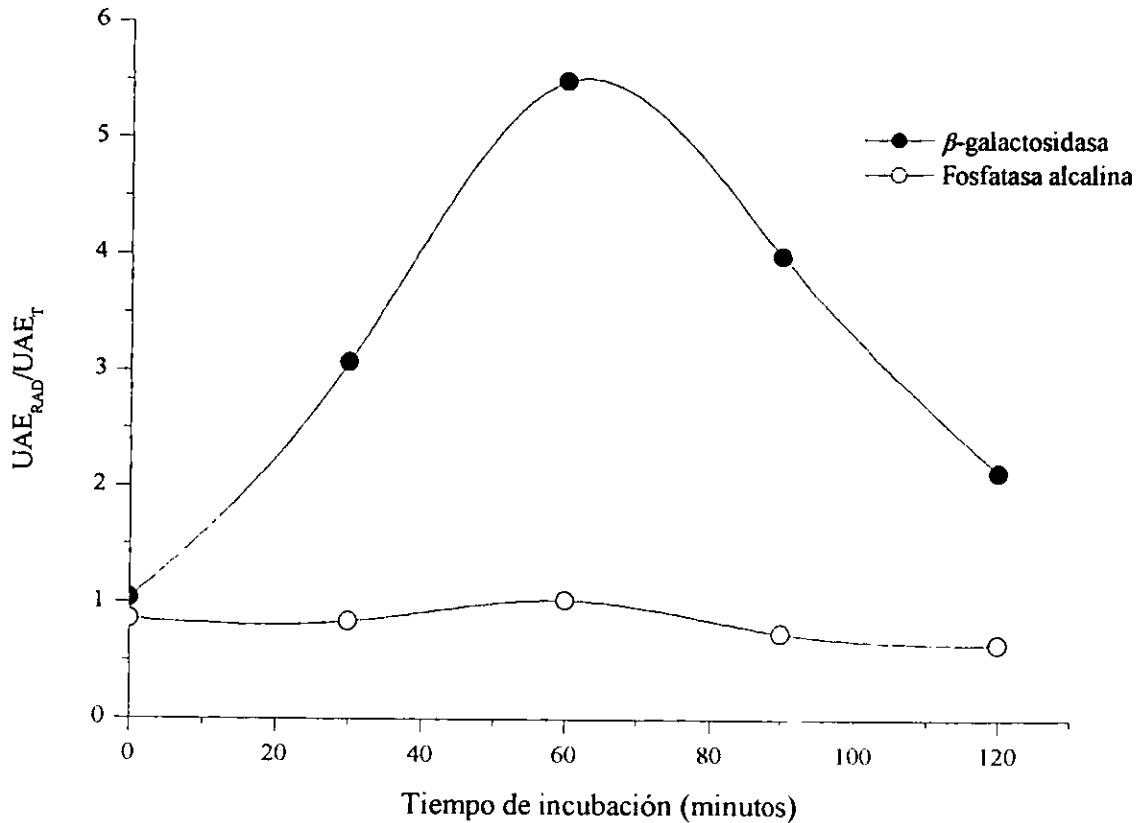


Figura 11. Cinética de actividad de SOS para PQ30. Se muestran los cocientes de las unidades de actividad enzimática en bacterias irradiadas y no irradiadas.

La actividad SOS es un evento temporal así que para asegurar la mayor sensibilidad es necesario establecer el tiempo que requiere para alcanzar su nivel óptimo. Como anteriormente se explicó, SOS se determina tomando en cuenta la relación entre dos enzimas una cuya actividad es constante (f -alc) y la otra temporal (β -gal). Se irradiaron las bacterias a una sola dosis (50 Gy) y se incubaron durante tres horas a 37 °C. A intervalos de 15 minutos se tomó una muestra y se calculó la actividad de las dos enzimas en función de la absorbencia a 420 nm. El cociente entre ambas indica el grado de actividad SOS, que en todas las cepas alcanza su nivel máximo transcurridos 60 minutos a partir de la irradiación. Como se aprecia en la figura 11 la actividad de β -gal aumenta con el tiempo mientras que la de fosfatasa alcalina permanece estable.

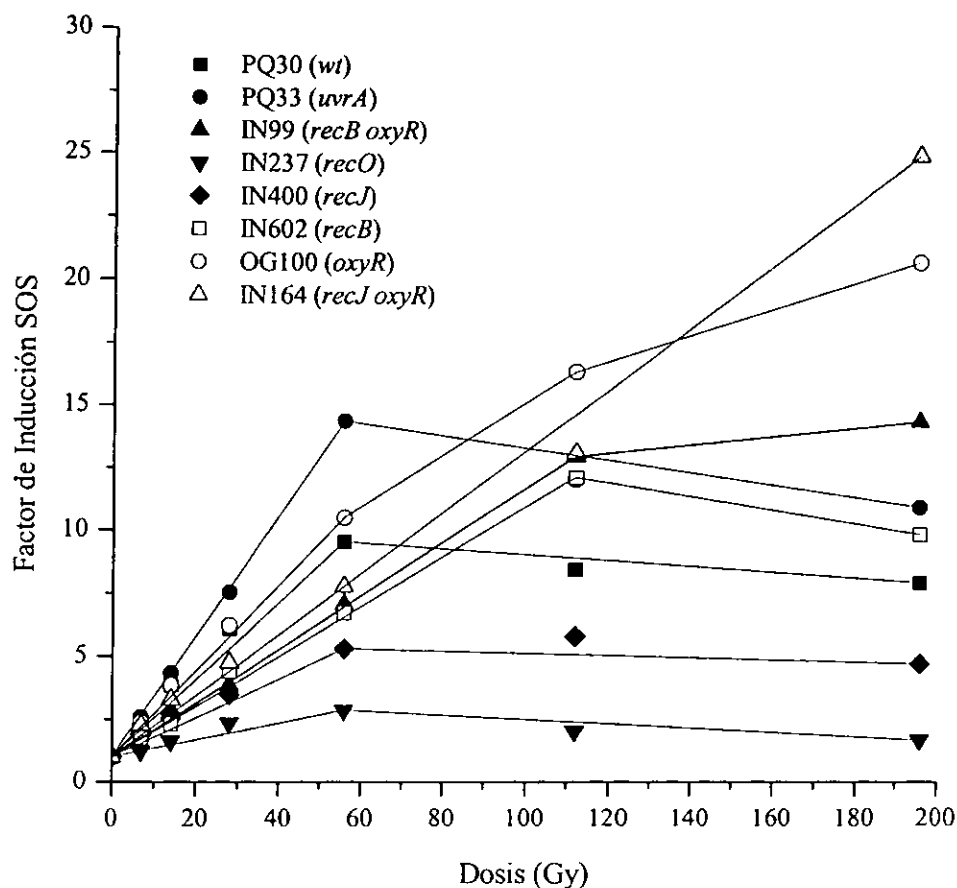


Figura 12. Respuesta SOS de las diferentes cepas de *E. coli* expuestas a radiación alfa. Cada punto representa el promedio de por menos tres experimentos.

El nivel que alcance SOS es función tanto del daño producido como de los distintos genes defectuosos en sistemas de protección o de reparación, como se aprecia en la figura 12 y en la tabla III. Esta última incluye tanto las potencias inductoras de SOS como las dosis de doblaje, que es la dosis de radiación necesaria para duplicar la tasa espontánea de transcripción, mínimo aceptable para considerarse como significativo.

En las cepas deficientes en el sistema de protección controlado por *oxyR*, la actividad SOS aumenta con la dosis, mientras que las que tienen el gen funcional alcanzan un nivel máximo a

56 Gy y en el caso de IN602 a los 112 Gy. Tanto en PQ33 *uvrA* como en OG100 *oxyR* la respuesta fue mayor que en PQ30, ya que en ellas la dosis de doblaje es la más baja a la vez que el SOSpi es mayor (tabla III). En los mutantes con defectos en genes de recombinación el nivel de actividad SOS tiende a ser menor al compararlo con el de la cepa silvestre, especialmente IN237 *recO* que apenas hasta los 14 Gy llega a duplicar el nivel basal de transcripción y en concordancia con esto su valor SOSpi es el más bajo de todos.

Tabla III. Dosis de doblaje (DD) y potencia inductora de SOS (SOSpi)

Cepa	DD (Gy)	SOSpi
PQ30 <i>wt</i>	4.00	0.25
PQ33 <i>uvrA</i>	3.03	0.33
IN237 <i>recO</i>	14.28	0.07
IN400 <i>recJ</i>	10.00	0.10
IN602 <i>recB</i>	6.66	0.15
OG100 <i>oxyR</i>	3.70	0.27
IN164 <i>oxyR, recJ</i>	6.25	0.16
IN99 <i>oxyR, recB</i>	7.14	0.14

6 DISCUSION

El efecto dañino de la radiación se puede evaluar de acuerdo con dos parámetros: la supervivencia y la activación de las funciones SOS. Se podría pensar que ambos indicadores son coincidentes, esto es a mayor letalidad mayor activación de SOS. Sin embargo al comparar la gráfica de supervivencia con la de SOS (figuras 10 y 12 respectivamente), se observa que esta premisa no siempre se cumple. Esto probablemente se deba a que el daño letal es diferente a aquél que da lugar a SOS ya que como se sabe, la principal responsable de la muerte celular es la ruptura doble, mientras que para que se induzca SOS, solamente se requiere ADN de una hebra.

6.1 Supervivencia

La muerte celular depende de dos factores: el primero es la probabilidad de que la radiación incida sobre las células, evento totalmente aleatorio; el segundo es la manera como las células respondan a esa agresión. La figura 10 refleja la contribución de los genes defectuosos a la supervivencia de las diferentes cepas irradiadas. Se nota que casi todas las curvas presentan de 0 a 112 Gy, una relación lineal cuya pendiente refleja la mayor o menor importancia de los distintos mecanismos de reparación. Las excepciones son IN99 e IN602, ambas deficientes en *recB* en las que la población disminuye de manera logarítmica lo que indica, al no haber reparación del daño y de acuerdo con la teoría del blanco (ver anexo I), que la muerte en estas cepas es un evento que depende de que la radiación incida, por lo menos una vez sobre cada célula. Tanto las pendientes como las DL_{37} en dichas cepas enfatizan la importancia que tiene el gen *recB* en la supervivencia. La enzima RecBCD es la principal responsable de la recombinación homóloga en *E. coli* (Kuzminov, 2000), además de ser esencial en la reparación de rupturas dobles (Sargentini y Smith 1985; Krunoslav *et al.*, 1991). La excesiva sensibilidad de las cepas deficientes en este gen, confirma que las rupturas dobles que permanecen sin reparar dan por resultado la muerte celular.

Los valores de pendiente y los de DL_{37} demuestran que tanto OG100 *oxyR* como IN164 *oxyR,recJ* tienen cierta sensibilidad, lo que resalta en primer lugar, la importancia de la protección contra agentes oxidantes representada por *oxyR* y en segundo lugar el papel de *recJ* en la reparación de las RDB's (Dianov *et al.*, 1994; Thoms y Wackelnager, 1998; Friedman y Cohen, 1998; Viswanathan y Lovett, 1999). Como la muerte celular se debe a rupturas dobles no reparadas, se infiere que parte de ellas se producen por efecto indirecto de la radiación alfa al generar gran cantidad de radicales, en su mayoría producto de la radiólisis del agua. En una bacteria con sistemas de protección intactos, gran parte de esos radicales se elimina o neutraliza antes de que llegue a reaccionar con el material genético, pero al estar defectuoso el regulón *oxyR*, se pierde parte de esta protección y como además los radicales están concentrados en un área limitada, la probabilidad de que ocurran RDBs por coincidencia de lesiones en bandas opuestas del ADN, es mucho mayor que en el caso de la radiación dispersa.

El mutante doble *oxyR,recJ* presenta una pendiente mayor que la del sencillo *oxyR*, lo que hace suponer que en algunos casos el producto de *recJ* puede ser necesario para reconocer y modificar un cierto tipo de RDB, por ejemplo rupturas con extremos dispares, para que la enzima RecBCD pueda llevar a cabo la reparación por recombinación como se describe en la figura 6 y según lo propuesto por diferentes autores (Corrette-Benett y Lovett, 1995; Friedman-Ohana y Cohen, 1998). En vista de que RecBCD solamente identifica los extremos romos de las RDB, será necesario que los que tienen disparidades se modifiquen para que dicha enzima los pueda reconocer. Se cuenta con evidencias de que la proteína RecJ, que degrada ADN de una banda en dirección 5'-3', puede llevar a cabo esta labor (Thoms y Wackelnager, 1998; Friedman y Cohen, 1998; Viswanathan y Lovett, 1999). Los datos sugieren que la deficiencia en *oxyR* en IN164 da por resultado mayor número de lesiones, muchas de las cuales pueden finalmente traducirse en rupturas dobles dispares que a su vez necesiten ser procesadas (por RecJ, por ejemplo) para servir de sustrato a RecBCD.

Al comparar la letalidad producida en PQ30 y OG100 por dos tipos de radiación ionizante (tabla IV), se nota que las DL_{37} por alfa son menores a las de gama. Una forma de comparar los diferentes tipos de radiación es mediante el cálculo de la eficacia biológica relativa, es

decir la dosis necesaria para producir el mismo efecto. Se tomó como referencia la DL₃₇ de radiación gama en PQ30 que por ser la única que no tiene defectos en genes de protección o reparación permite comparar a los dos tipos de radiación ionizante. En este sentido se determinó que a las condiciones experimentales en las que se trabajó que como se esperaba la EBR de las partículas alfa es de 2.449 con relación a los rayos gama. Este factor no se observa en los demás mutantes, especialmente los que tienen defectos en los genes *rec*, ya que estas deficiencias enmascaran las diferencias entre los distintos tipos de radiación. En tales mutantes (*recB* y en menor grado *recJ* y *recO*) incapaces de eliminar total o parcialmente el daño letal, basta solamente una ruptura doble no reparada para que la célula muera, así que aunque haya muchas RDB, la mayoría serían redundantes y por tanto no modificarían el resultado final.

Tabla IV. Comparación entre los valores de DL₃₇ obtenidos con partículas alfa y rayos gama (Breña y Serment, 1998)

Cepa	Partículas alfa	Rayos gama
PQ30	131.24	321.36
PQ33	117.46	103.87
IN237	81.00	78.14
IN400	88.59	88.37
IN602	34.78	32.02
OG100	95.48	165.27
IN164	86.62	85.50
IN99	29.86	16.64

6.2 Respuesta SOS

La interpretación de los resultados en cuanto a la magnitud de la respuesta SOS es más compleja pues en conjunto son el producto de diversos factores. De las gráficas que ilustran el grado de activación del sistema, se desprenden aspectos interesantes. En primer lugar, en todas se alcanza una saturación a 56 Gy, a excepción de las bacterias con el defecto en *oxyR*, en las que la actividad continúa aumentando en función de la dosis de radiación. Aquí se pone de manifiesto la importancia de los radicales generados por la radiólisis del agua como causantes

de daño genético. En las condiciones de experimentación utilizadas, 56 Gy equivalen a 40 minutos de exposición, tiempo suficiente para que se active *oxyR* y aumenten los niveles de las proteínas reguladas por dicho gen. Al parecer lo que estimula al sistema es el aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno intracelular (Zheng *et al.*, 1998) ya que hasta donde se sabe, las enzimas de este regulón no atrapan radicales libres directamente sino que eliminan el excedente de peróxidos. A través de la radiólisis del agua se produce H_2O_2 , ya sea por reacción directa entre dos radicales OH^\bullet ó indirectamente vía las superóxido dismutasas. Si no se elimina el H_2O_2 se corre el riesgo de que ingrese al ciclo de Fenton y por mediación de metales de transición (cobre o hierro) se generen más radicales hidroxilo que a su vez reaccionarían con el material genético. De ahí que las cepas carentes de esa protección incapaces de eliminar el exceso de H_2O_2 parecen tener una mayor cantidad de lesiones, como se refleja en las curvas de dosis/respuesta de OG100 *oxyR*, IN164 *oxyR recJ* y en menor grado de IN99 *oxyR,recB*. En los experimentos con rayos gama no se notó ninguna diferencia seguramente porque la razón de dosis de la fuente emisora era 10 veces mayor y se requerían períodos de exposición mucho más cortos lo que era insuficiente para estimular a este sistema de protección.

Otro aspecto a considerar se refiere a las potencias de inducción SOS en el intervalo de 0 a 56 Gy. De todas las cepas estudiadas, sólo el de PQ33 *uvrA* supera al de la silvestre PQ30. Los SOSpi de las demás son menores, hasta llegar al de IN237 *recO* que es el más bajo.

El nivel que alcancen las funciones SOS depende del total de lesiones al ADN, factor que a su vez está determinado por la eficacia de los sistemas de protección, de reparación y finalmente por la necesidad de procesamiento previo en algunos casos. Cuando algún mecanismo de reparación no está funcionando en forma adecuada, aumenta la cantidad de lesiones susceptible de inducir SOS, como puede confirmarse por la disminución en la dosis de doblaje así como por una mayor potencia inductora de SOS en PQ33. Anteriormente se pensaba que la escinucleasa UvrABC no tenía mayor relevancia en la recuperación al daño por radiación ionizante, pero diferentes autores han comprobado que también es capaz de reconocer y reparar bases oxidadas (Lin y Sancar, 1989; Kow *et al.*, 1990; Roldán- Arjona y Sedgwick, 1996; Kuipers *et al.*, 1999; Kuipers *et al.*, 2000). Los resultados aquí presentados confirman la

importancia del sistema de reparación por escisión de nucleótidos pues de todas las cepas, PQ33 es la que tiene la mayor sensibilidad.

Si bien *uvrA* representa una contribución significativa en la reparación del daño, los resultados indican que también *recJ* es importante para la eliminación de bases oxidadas, como lo muestra la respuesta del mutante doble *oxyR,recJ* en el que la actividad SOS continúa aumentando en función de la dosis de irradiación (figura 12). De aquí se deduce que la falta de actividad de *oxyR* no sólo propicia que se acumule más daño sino que para eliminar al menos parte de ese daño, es necesaria la intervención de la exonucleasa RecJ.

Finalmente está la posibilidad de que ciertas lesiones solamente conduzcan a la activación de SOS si son previamente modificadas. Lo anterior se deduce del comportamiento del mutante IN237 *recO* en el que la potencia de inducción de SOS es menor al de todas las demás cepas incluyendo a la silvestre que cuenta con todos sus sistemas de protección y de reparación, activos. La participación de *recO* en el procesamiento de las lesiones conducente a la activación de SOS ya había sido propuesta anteriormente (Whitby y Lloyd, 1995; Hedge *et al.*, 1995). Se supone que cuando el producto de este gen, que es a su vez parte de un complejo proteico llamado FOR no funciona, RecA no puede desplazar a la proteína SSB con la cual compite por las regiones de ADN de una banda y en consecuencia no puede haber la unión RecA-ADN (ver figura 6). Como resultado de todo esto la actividad de dicho regulón se inhibe casi por completo (Umezu y Kolodner, 1994; Hedge *et al.*, 1995; Whitby y Lloyd, 1995; Breña y Serment, 1998).

Todo lo anterior indica que cuando *oxyR* funciona en forma normal, el sistema controlado por este gen elimina una parte de los peróxidos antes de que actúen sobre el ADN, con lo que se reduce la cantidad de lesiones y con ello la probabilidad de que se produzcan en sitios cercanos entre sí, de tal modo que el total de RDB es menor. Sin embargo, la protección no es total y se producen lesiones dispersas a lo largo de la molécula de ADN. Una buena parte de estas lesiones sucede en las bases, que al ser eliminadas por diversas endonucleasas, dejan huecos en la molécula (Viswanathan y Lovett, 1998; Cox, 1998). En este punto se reflejaría la

importancia del gen *recJ* para el procesamiento de lesiones previo a la inducción de SOS. La enzima RecJ puede reconocer los huecos en el ADN dejados por una endonucleasa o bien huecos dejados por la polimerasa y a partir de ahí degradar una de las hebras del ADN (dirección 5'-3') agrandando el hueco y permitiendo de este modo la entrada de polimerasas para reparar este tipo de lesiones (Dianov *et al.*, 1994; Viswanathan y Lovett, 1998). Al no estar presente el producto de *recJ* estas rupturas permanecerían por más tiempo lo que va propiciando la iniciación de la respuesta. Dado que la ausencia de *oxyR* permite que se produzca una mayor cantidad de oxidaciones en el ADN, habrá también mayor cantidad de huecos, lo que a su vez explica que la actividad SOS en el doble mutante *recJ,oxyR* sea mayor que en las demás cepas incluyendo la silvestre. Por último en el caso de IN400 *recJ* la deficiencia en este gen impediría que se lleve a cabo el procesamiento de las rupturas dobles que induciría a SOS con lo que disminuye la respuesta tal como se había propuesto anteriormente.

6.3 Modificaciones al modelo propuesto

El objetivo principal de este trabajo era el aportar evidencias que apoyaran el modelo basado en los resultados con radiación gama, que planteaba la intervención conjunta de los productos de *recJ* y *recO* para el procesamiento de RDB necesario para la inducción de SOS (Breña y Serment, 1998). Se decidió utilizar un tipo de radiación ionizante que produjera mayor cantidad de RDB's para que fuera más evidente la presunta necesidad de que dichos genes intervinieran. Aunque los resultados confirman la hipótesis en forma parcial, al mismo tiempo dirigen las cosas hacia otra dirección.

Es evidente que *recB* es esencial para la reparación de RDB (figura 10), sin embargo su influencia en la activación de SOS, si es que la hay, es mínima lo que apoya el supuesto de que las rupturas dobles en su mayoría se eliminan directamente por recombinación y sólo algunas que por alguna razón fueran inaccesibles a la enzima RecBCD podrían dar lugar, previa modificación, a la activación de SOS.

En cambio el gen *uvrA*, que es responsable al menos parcialmente, de la reparación de bases dañadas que a su vez parecen ser el principal daño conducente a SOS, no es particularmente relevante para la supervivencia pero en su defecto aumenta notablemente el potencial de inducción SOS. Además este daño consiste de bases oxidadas, según se deduce de la marcada diferencia entre la actividad SOS de las cepas que tienen el gen *oxyR* funcional y aquéllas deficientes en dicho sistema.

A pesar de que en el mutante sencillo *recJ* hubo disminución de la respuesta SOS, el hecho de que el doble mutante *oxyR,recJ* sea el que presente el nivel más alto de SOS, contradice la idea de que la principal actividad de la enzima RecJ sea el procesamiento o la modificación de RDB conducente a la activación de la respuesta SOS.

Cabe suponer entonces que la ausencia de *oxyR* daría por resultado una mayor cantidad de daño conducente a SOS, que consistiría principalmente de bases oxidadas ya que las RDB se eliminarían por otra vía. Tomando en cuenta el papel de RecJ dentro del proceso de eliminación de bases dañadas (Viswanathan y Lovett, 1998; Friedman y Cohen, 1998) esta función pasaría a ocupar un primer plano mientras que el del procesamiento de RDB (Breña y Serment, 1998) sería de menor importancia. En estas circunstancias la suma de dos deficiencias (*oxyR* y *recJ*) explica el incremento en SOS que presenta la cepa IN164.

Por su parte la disminución de la actividad de SOS en ausencia del gen *recO* reafirma lo sugerido anteriormente sobre la importancia de este gen en los procesos previos a la inducción de esta vía (Umezú y Kolodner, 1994; Hedge *et al.*, 1995; Whitby y Lloyd, 1995; Breña y Serment, 1998). En el esquema de la figura 13 se representa el daño al ADN expresado en rupturas de una o dos bandas y lesiones en las bases. Si *oxyR* está funcionando, la proporción entre RBS, RDB's y daño en las bases se mantendría relativamente constante pero en su defecto aumentaría la proporción de lesiones en las bases, especialmente oxidaciones. En el primer caso, la contribución relevante de *recJ* sería la modificación de RDB's para ser reconocidas por RecA e iniciar la respuesta SOS. En el segundo, su papel principal sería en

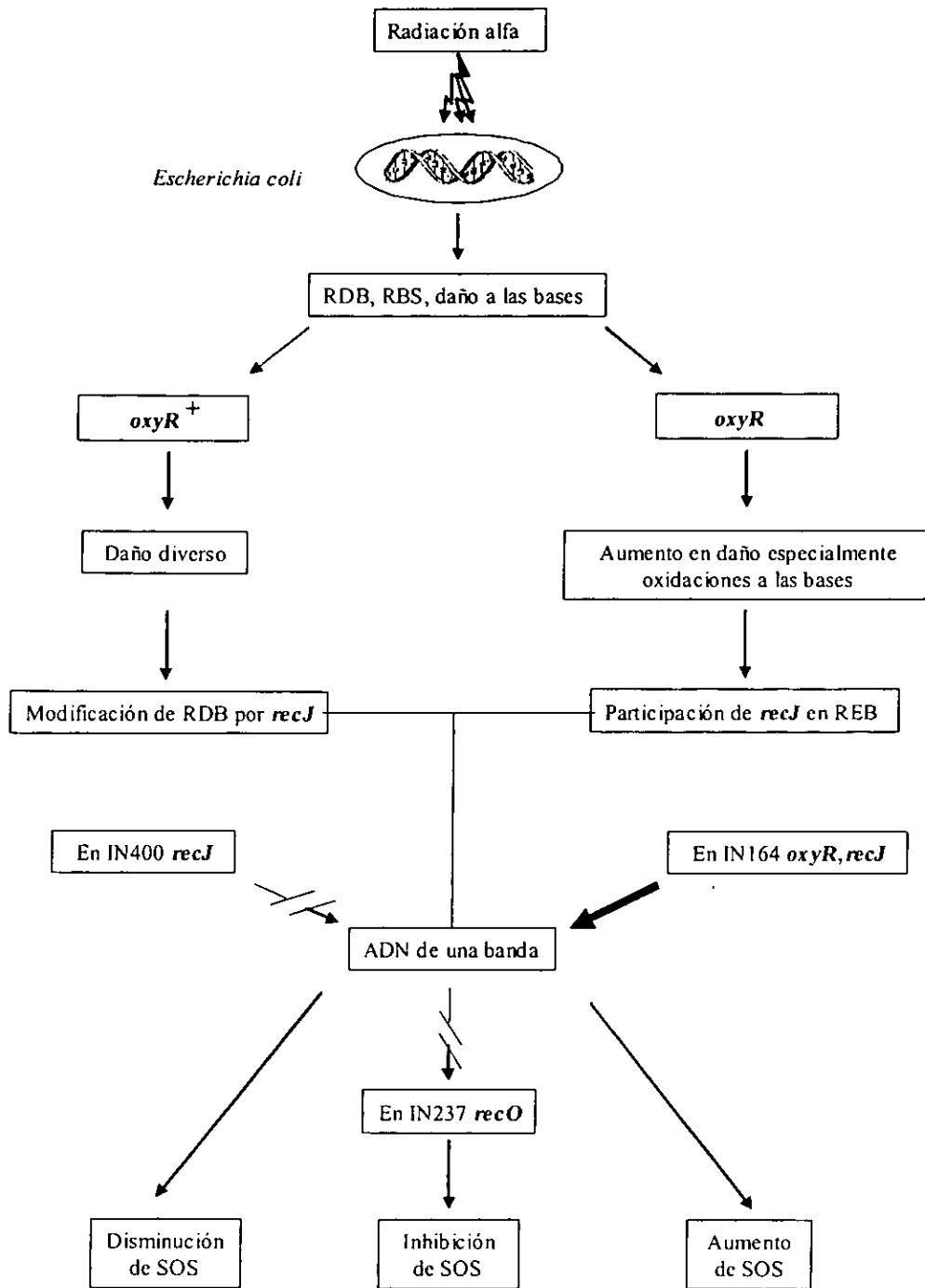


Figura 13. Esquema que explica con base en los resultados obtenidos el papel de *recJ* en ausencia o presencia del sistema de protección controlado por *oxyR*.

calidad de exonucleasa que alargara los huecos formados por las endonucleasas AP a fin de facilitar la entrada de la polimerasa I que finaliza el proceso REB. Así se observa que en IN400 *recJ*, la carencia del gen daría por resultado la disminución de SOS, mientras que en IN164 *recJ,oxyR* el aumento en las bases oxidadas aunado a una menor eficiencia en su eliminación, resultaría en el incremento de la respuesta. Cabe aclarar que los resultados aquí esquematizados si bien apoyan el presunto papel de *recJ* en el procesamiento de RDB's enfatizan también su participación en la reparación de bases oxidadas. Además se incluye a *recO* en la disposición del ADN de una hebra para la unión de RecA como parte final del proceso previo a la activación de SOS.

6.4 Relevancia de las funciones SOS en *Escherichia coli*.

Cuando Radman propuso la existencia del sistema SOS de *Escherichia coli* pensó que éste era el último recurso de la bacteria para sobrevivir al daño en el material genético. Su hipótesis se basó en investigaciones donde se comprobaba que *E. coli* puede reparar una buena cantidad de dímeros de pirimidina siguiendo diferentes rutas: la fotorreactivación, la reparación por escisión, la recombinación y finalmente, otro mecanismo que entonces se conocía como reactivación W, que requería síntesis proteica *de novo* y que se encargaba de los dímeros que escaparan a los demás procesos. El resultado final era una mayor supervivencia así como un aumento en la frecuencia de mutaciones. De ahí se propuso a SOS como sistema de respaldo que ayudaba a enfrentar las lesiones cuando los demás mecanismos eran ya insuficientes.

Como se mencionó antes, puede haber una gran diversidad de lesiones, sin embargo SOS, que para la bacteria representa un gran gasto energético, solamente se activa ante regiones de una sola hebra y en situaciones especiales. Esto sugiere que la respuesta depende de que otros mecanismos generen este tipo de estructuras de tal modo que independientemente del tipo de daño en el ADN, este será reparado o modificado por los sistemas que estén disponibles, antes de que finalmente se activen dichas funciones.

Todo lo anterior hace pensar que las funciones SOS no son solamente un sistema de reparación sino que su importancia va más allá. En éste y en otros trabajos (Suárez, 1997; Breña y Serment, 1998) se ha observado que no parece haber una relación directa entre la inducción de las funciones SOS y la supervivencia a diversos agentes incluyendo a la radiación, lo que sugiere que dicho sistema, a pesar de que involucra mecanismos de reparación y tolerancia, no representa un papel primordial que evite la muerte celular. Recientemente se ha propuesto la idea de que la importancia real de las funciones SOS radica en el aumento en la frecuencia de mutaciones como una alternativa para aumentar la variabilidad genética y de este modo incrementar las probabilidades de sobreponerse a las condiciones adversas del entorno (Radman, 1999; Friedberg y Gerlach, 1999).

7 Referencias

- Arena, V. (1971). Ionizing Radiation and Life. Mosby, St. Louis,. 453 p.
- Aslund, F., M. Zheng, J. Beckwith y G. Storz (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:6161-6165.
- Bhatia, P., Z. Wang, y E. Friedberg (1996). DNA repair and transcription. *Current Opinion in Genetics & Development*, **6**:146-150.
- Breña, M., L. Tavera y M. Balcázar (1996). SOS induction by low activity α sources: microdosimetric considerations. *Int. J. Radiat. Biol.*, **69**:219-224.
- Breña-Valle, M. y J. Serment-Guerrero (1998). SOS induction by γ -radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis*, **13**:637-641.
- Bochner, B., H. Huang, G. Schieven y B. Ames (1980). Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J. Bacteriol.*, **143**:926-933.
- Casarett, A. (1968). Radiation Biology Prentice-Hall, Englewood, New Jersey, 367 p.
- Corrette-Benett, S. y S. Lovett (1995). Enhancement of RecA-transfer activity by the *recJ* exonuclease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **270**:6881-6885.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. Brown y P. Hanawalt (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, **158**:41-64.
- Cox, M. (1998). A broadening view of recombinational DNA repair in bacteria. *Genes to Cell*, **3**:65-78.
- Demple, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.*, **25**:315-337.
- Demple, B. (1999). Radical ideas: genetic responses to oxidative stress *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **26**:64-8

- Dianov, G., B. Sedgwick, G. Daly, M. Olsson, S. Lovett y T. Lindahl (1994). Release of 5'-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein. *Nucleic Acids Res.*, **22**:993-998
- Eisenstark, A., M. Calcutt, M. Becker-Hapak y A. Ivanova (1996). Role of *Escherichia coli* *rpoS* and associated genes in defense against oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **21**:975-93
- Friedberg, E. (1985). DNA repair. Freeman, New York, 613 p.
- Friedberg, E. C. Graham y W. Siede (1995). DNA repair and Mutagenesis. ASM press, Washington, USA.
- Friedberg, E y V. Gerlach (1999). Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell*, **98**:413-416.
- Friedman, R. y A. Cohen (1998). Heteroduplex joint formation in *Escherichia coli* recombination is initiated by pairing of a 3'-ending strand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:6909-6914.
- Fuller-Pace, F. y N. Murria (1986). Two DNA recognition domains of the specificity polypeptides of a family of type I restriction enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:9368-9372.
- Gentner, N. y M. Paterson (1984). Damage and repair from ionizing radiation. En: Reparable lesions in microorganisms. Edit. Hurst, A. y A. Nasim, Academic Press, 58-84 p.
- Glassner, B. L. Posnick y L. Samson (1998). The influence of DNA glycosilases on spontaneous mutation. *Mutat. Res.*, **400**:33-44.
- González-Flecha, B. y B. Demple (1997). Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **179**:382-388.
- González-Flecha, B. y B. Demple (2000). Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. *Ann. NY Acad. Sci.*, **899**:69-87.
- Goodhead, D. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**:7-17.

- Harris, R., K. Ross, M. Lombardo y S. Rosenberg (1998). Mismatch repair in *Escherichia coli* cells lacking single-strand exonucleases ExoI, ExoVII and RecJ. *J. Bacteriol.*, **180**:989-993.
- Hedge, S., J. Sandler, A. Clark y M. Madiraju (1995). *recO* and *recR* mutations delay induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **246**:254-258.
- Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **21**:887-93
- Kato, T., M. Watanabe y T. Ohta (1994). Induction of the SOS response and mutations by reactive oxygen-generating compounds in various *Escherichia coli* mutants defective in the *mutM*, *mutY* or *soxRS* loci. *Mutagenesis*, **9**:245-51
- Kow, S., S. Wallace y B. van Houten (1990). UvrABC nuclease complex repairs thymine glycol, an oxidative DNA base damage. *Mutat. Res.*, **235**:147-156.
- Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**:751-813.
- Lin, J. y A. Sancar (1989). A new mechanism for repairing oxidative damage to DNA: (A)BC excinuclease removes AP sites and thymine glycols from DNA. *Biochemistry*, **28**:7979-7984.
- Lin, J. y A. Sancar (1992). Active site of (A)BC excinuclease. II. Binding, bending, and catalysis mutants of UvrB reveal a direct role in 3' and an indirect role in 5' incision. *J. Biol. Chem.* **267**:17688-17692
- Little, J. (1984). Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:1375-1379.
- Loewen P., B. Hu, J. Strutinsky y R. Sparling (1998). Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, **44**:707-17
- Loewen P. y R. Hengge-Aronis (1994). The role of the sigma factor σ^7 (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**:53-80.
- Loewen, P., J. Switala y B. Triggs-Raine (1985). Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**:144-149.

- Maloy, S. y W. Nunn (1981). Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **145**:1110-1112.
- Michán, C., M. Manchado, G. Dorado y C. Pueyo (1999). *In vivo* transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J. Bacteriol.*, **181**:2759-2764.
- Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour, NY. 466 p.
- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, **25**:229-253.
- Myles GM y Sancar, A (1989). DNA repair. *Chem. Res. Toxicol.*, **2**:197-226
- Mulvey, M. y P. Loewen (1989). Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests that Kat protein is a novel σ transcription factor. *Nucleic Acids Res.*, **17**:9979-9991.
- Parker, B. y M. Marinus (1992). Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:1730-1734.
- Pérez, M. (2001). Efecto de la radiación alfa en el sistema biológico de *Escherichia coli*. Tesis de maestría en Ingeniería Nuclear, Escuela Superior de Física y Matemáticas, IPN.
- Quillardet, P. and M. Hofnung, (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.*, **147**:65-78.
- Radman, M. (1974). Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. En: *Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis*. Edit. L. Prakash, F. Sherman, M. Miller, C. Lawrence y H. W. Tabor. Charles C. Thomas, Springfield, IL. Pp. 128-142
- Radman, M. (1999). Enzymes of evolutionary change. *Nature*, **401**:866-7, 869
- Retel, J., B. Hoebee, J. Braun, J. Lutgerink, E. Akker, A. Wanamarta, H. Joenje y V. Lafleur (1993). Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, **299**:165-182.
- Roldan-Arjona, T. y B. Sedwick (1996). DNA base damage induced by ionizing radiation recognized by *Escherichia coli* UvrABC nuclease but not Nth or Fpg proteins. *Mol. Carcinog.* **16**:188-196.

- Sak, BD., A. Eisenstark y Touati D. (1989). Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:3271-3275.
- Sancar, A. y G. Sancar (1988). DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**:29-67.
- Storz, G., L. A. Tartaglia, S. B. Farr y B. Ames (1990). Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in genetics*, **6**:363-368.
- Suárez, S. (1997). Influencia de los genes *recO* y *recJ* en la respuesta a radiación ultravioleta y a algunos mutágenos químicos. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UAEM.
- Sutherland, B., P. Bennett, O. Sidorkina y J. Laval (2000). Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionising radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:103-108.
- Téoule, R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **51**:573-89
- Thoms, B. y W. Wackernagel (1998). Interaction of RecBCD enzyme with DNA at double-strand breaks produced in UV-irradiated *Escherichia coli*: Requirement for DNA end processing. *J. Bacteriol.*, **180**:5639-5645.
- Touati, D. (2000). Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*—how many ways are there to trigger *soxRS* response? *Redox Rep.*, **5**:287-293.
- Umezu, K. y R. Kolodner (1994). Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*: Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA binding protein. *J. Biol. Chem.*, **269**:30005-30013.
- Viswanathan, M. y S. Lovett (1998). Single-strand DNA-specific exonucleases in *Escherichia coli*: roles in repair and mutation avoidance. *Genetics*, **149**:7-16.
- Viswanathan, M. y S. Lovett (1999). Exonuclease X of *E. coli*, a novel 3'-5' DNase and DnaQ superfamily member involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.*, **274**:30094-30100.
- Walker, GC. (1987). The SOS response of *E. coli*. En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Edit. FC. Neidhardt, JL. Ingraham, KB. Low, B.

Magasanik, M. Schaechter y HE. Umbarger,. Am. Soc. *Microbiol.*, Washington, DC. 2:1346-1357

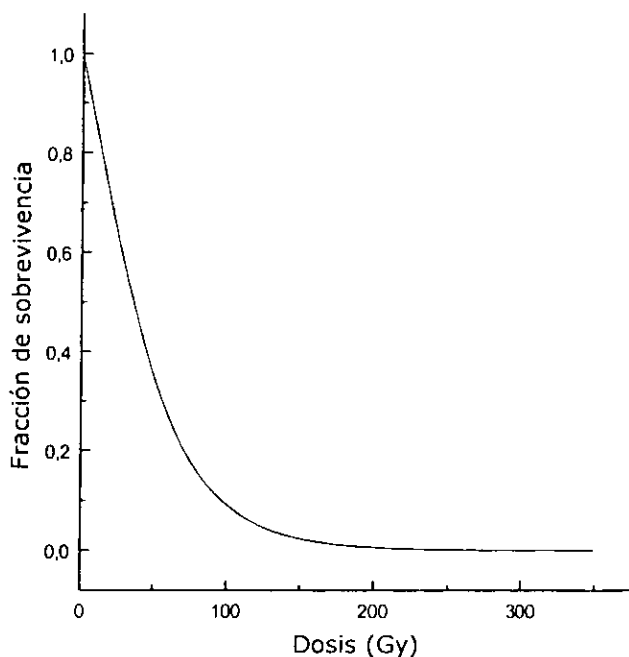
- Whitby C. y R. Lloyd (1995). Altered SOS induction associated with mutation in *recF*, *recO* and *recR*. *Mol. Gen. Genet.*, 246:174-179.
- Yang, W. (2000). Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat. Res.*, 460:245-256.
- Zahrt, T. y S. Maloy (1997). Barriers to recombination between closely related bacteria: MutS and RecBCD inhibit recombination between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 94:9786-91
- Zhang, A., S. Altuvia, A. Tiwari, L. Argaman, R. Hengge-Aronis y G. Storz (1998). The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J.*, 17:6061-8
- Zheng, M., F. Åslund y G. Storz (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279:1718-1721.

ANEXO I

Teoría del blanco

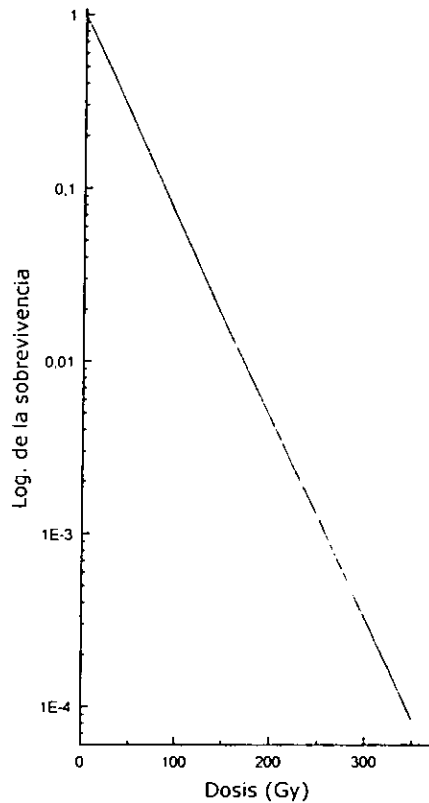
La teoría del blanco, propuesta en la década de los 30's por Crowthers, Timoféeff-Ressovsky y Delbrück establece que la producción de ionizaciones en o muy cerca de una molécula o estructura (blanco) es responsable del efecto que se está evaluando. A la producción de un evento se le conoce como golpe. Esta teoría se aplica en estudios de supervivencia o inhibición de crecimiento. En una forma simplista la teoría del blanco establece que un golpe es suficiente para producir un evento en una población celular.

Al realizar experimentos de supervivencia de microorganismos a dosis crecientes de radiación ionizante se obtiene una gráfica de este tipo:



Se observa que si una dosis X que mata al 50% de la población se duplica no mata al 100% de las células, sino que elimina al 50% de la población restante. Un nuevo incremento en la dosis

matará del mismo modo al 50% de las células restantes y así sucesivamente. El número de organismos muertos por incremento de dosis no es igual pero la proporción de la población que se elimina por dicho incremento de dosis sí lo es. Se observa pues una relación de dosis respuesta de tipo exponencial que implica una disminución geométrica de la población por unidad de dosis recibida. Si estos datos de supervivencia en la figura anterior se grafican en escala semilogarítmica se obtiene una línea recta:



Esta curva se ajusta a la ecuación:

$$S = e^{-kD}$$

en donde

S = fracción de supervivencia después de una dosis D

e = base de logaritmo natural

k = constante de proporcionalidad que corresponde a la pendiente de la curva.

Esta ecuación también se puede expresar de la siguiente manera:

$$\ln S = -kD$$

Para explicar esto se puede hacer una analogía: consideremos a una caja con 16 divisiones como la población celular. Si se arrojan 8 pelotas al azar en esa caja 50% de las divisiones quedarán ocupadas por una pelota. Si se arrojan 8 pelotas más, no necesariamente ocuparán el 50% restante de la caja, sino que algunas pelotas quedarán en una división que ya estaba ocupada, de modo que lo más probable es que se ocupe sólo el 50% de las divisiones que estaban vacías. Cada subsiguiente grupo de ocho pelotas reducirá la población restante en un 50%.

	①	①	
①		①	①
	①		
	①		①

Primera exposición

	②		②
	①	①	
②			②
①		①	①
			②
	①		
②	②	②	
	①		①

Segunda exposición

Después de la segunda “exposición” quedaron solamente 4 celdas sin recibir ninguna pelota, 4 recibieron sólo una pelota y el resto recibió dos. Para calcular cuantos blancos recibieron uno, dos tres o ningún impacto se aplica la fórmula de Poisson:

$$P_n(a) = \frac{e^{-a} a^n}{n!}$$

Cuando $a=1$

$$P_n = \frac{e^{-1}}{n!}$$

Cuando el promedio (a) de golpes por blanco es 1, esto es, cuando la cantidad de impactos es igual a la cantidad de blancos, la población queda de la siguiente manera:

37% no recibe ningún impacto ($e^{-1}/0! = e^{-1}/1 = 0.37$)

37% recibe un solo impacto ($e^{-1}/1! = e^{-1}/1 = 0.37$)

18% recibe dos impactos ($e^{-1}/2! = e^{-1}/2 = 0.18$)

6% recibe tres impactos ($e^{-1}/3! = e^{-1}/6 = 0.06$)

etc.

Así pues cuando el promedio de golpes por blanco es 1 va a sobrevivir el 37% de la población, de modo que la relación hasta este punto es lineal. En la práctica se hace lo inverso: a partir de una gráfica se determina la dosis a la que sobrevive el 37% de la población (DL_{37}) y generalmente se da como un parámetro de sensibilidad de un grupo de células determinado.

ANEXO II

Medios de cultivo y amortiguadores

□ **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

□ **Medio selectivo para mutantes sensibles a tetraciclina***

agarosa	12 g
triptona	10 g
extracto de levadura	5 g
cloruro de sodio	10 g
glucosa	0.2%
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	10 g
clorotetraciclina-HCl	20 µg/ml
ácido fusárico	12 µg/ml
cloruro de zinc 20mM	0.5 ml
Agua bidestilada	1 L

□ **Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4***

NaH₂PO₄·H₂O (0.2 M) 120 ml

Na₂HPO₄ (0.2 M) 880 ml

□ **Amortiguador B (para β-galactosidasa)**

Na₂HPO₄ 16.1 g

NaH₂PO₄ 5.5 g

KCl 0.75 g

MgSO₄·H₂O 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 [C₄H₁₁NO₃] 121 g

SDS 1 g

Se ajusta a pH 8.8 y se afora a 1 L