

Tesis de Posgrado

Inducción de variaciones hereditarias en la estructura macromolecular de bacteriófagos mediante ácido nitroso

Wieder, Carolina María

1961

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Físico-Matemáticas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Wieder, Carolina María. (1961). Inducción de variaciones hereditarias en la estructura macromolecular de bacteriófagos mediante ácido nitroso. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1100_Wieder.pdf

Cita tipo Chicago:

Wieder, Carolina María. "Inducción de variaciones hereditarias en la estructura macromolecular de bacteriófagos mediante ácido nitroso". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1961.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1100_Wieder.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCEN-BA.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

INDUCCION DE VARIACIONES HEREDITARIAS EN LA ESTRUCTURA
MACROMOLECULAR DE BACTERIOFAGOS MEDIANTE ACIDO NITROSO

CAROLINA MARIA WIEDER

Tesis presentada para optar al
Título de Doctora en Ciencias
Físico-Matemáticas

Año 1961

Tesis: 1100

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente el estímulo y asesoramiento brindados por el Profesor de la Cátedra de Genética Ing. Agr. Juan I. Valencia, como así también a las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales cuyo apoyo permitió la continuidad de este trabajo.

Mi sincero reconocimiento al Director del Max Planck Institut für Virusforschung Tübingen, Alemania, Prof. Dr. Friedrich Freese y especialmente al Dr. Walter Vielmetter, del mismo instituto, cuya valiosa orientación permitió dar comienzo y realizar gran parte de las experiencias en esta línea de trabajos en bacteriófagos durante mi permanencia en ese instituto de investigaciones con motivo de una beca otorgada por la Fundación Alexander von Humboldt, Bonn, Alemania.

Asimismo deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Armando Parodi, Profesor de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires por las facilidades concedidas en su laboratorio que permitieron la realización de una parte de las experiencias.

I.- INTRODUCCION

Morfología de bacteriófagos. Dimensiones. Tabla nº 1.

Constitución interna.

Clasificación de bacteriófagos.

Estructuras macromoleculares. Ácidos nucleicos.

Fases del ciclo vital del bacteriófago. Fase infecciosa. Fase vegetativa. Cambio que se operan en el sistema fago-bacteria después de la infección. Período de eclipse. Morfología de fagos incompletos. Análisis químico de la fase vegetativa. Lisis. Factores químicos en la síntesis del ADN. Fase previrus.

"Trafferttheorie". Radiobiología. Efectos de las radiaciones en bacteriófagos.

Investigaciones y estudios previos cuyos resultados condujeron a planear el presente trabajo. Elección de un sistema adecuado para el estudio de la desaminación del ácido desoxirribonucleico.

II.- MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Cultivo de bacterias. Obtención de bacteriófagos en suspensiones de concentración elevada. Método de Gratia para la determinación del título de fagos y para la observación de la morfología de placas. Obtención de una suspensión de fagos de mayor grado de pureza.

III.- RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Inactivación de T₂ mediante ácido nítrico. Desarrollo de la experiencia. Controles. Tablas de valores números 2,3,4 y 5. Curvas.

Inactivación de T₃. Tablas de valores nº 6,7,8, y 9. Gráfico. Tabla 10. Mutagénesis. Diversos fenotipos de mutantes. Controles. Tratamiento de los resultados y su interpretación. Se excluye la posibilidad de un proceso de selección. Efecto mutagénico (del ácido nítrico sobre el bacteriófago T₂) en función del tiempo. Efecto del ácido nítrico en la estructura del fago. Tabla nº 11. Estabilidad hereditaria de las mutantes obtenidas. Experiencias de reconstrucción. Confrontación de resultados. Efecto genético de la desaminación. Interpretación genética de los resultados.

IV.- RESUMEN APÉNDICE: Abreviaturas empleadas. Medios nutritivos. Bibliografía.

INTRODUCCION

Las ciencias biológicas estudian seres y fenómenos de extraordinaria complejidad como lo son todos los que participan de la vida.

Al esclarecimiento de los fenómenos vitales y al conocimiento de las estructuras finas de los seres vivos contribuyen algunas especialidades tales como Biofísica, Genética, Biología Molecular, Biofísica Química y Electrofisiología, mereciendo especial atención los temas relacionados con las estructuras macromoleculares y sus interacciones, los intercambios energéticos y la información biológica.

Todo ser viviente está caracterizado por estructuras moleculares que le confieren una organización altamente específica y que a la vez interactúan entre sí y con el ambiente de tal manera que permiten el metabolismo, la reproducción, el crecimiento y la adaptación (17.1). Más aún, las características esenciales de cada especie están determinadas por moléculas que poseen la propiedad de autorreplicarse y que constituyen la base para la síntesis de los demás sustanciales destinados a un nuevo organismo similar al progenitor.

Los procesos biológicos pueden ser examinados desde el punto de vista de las estructuras moleculares, de los niveles de energía y de las fuerzas de unión. Frente al elevado grado de diferenciación celular que constituye un serio inconveniente para el estudio de estos fenómenos se ha optado por otros sistemas que ofrecen mayor sencillez de organización. Tal vez el virus constituye el sistema de mayor simplicidad en el cual es posible estudiar los fenómenos vitales (reproducción, intercambios metabólicos mutagénesis, etc.).

Los virus pueden ser conservados durante años como si se tratara de sustancia orgánica metabólicamente inerte

(algunos son cristalizables) y sólo manifiestan fenómenos vitales, cuando se los pone en contacto con un huésped específico (célula vegetal o animal, tejido, bacteria, etc).

Desde su descubrimiento los virus filtrables atrajeron la atención de los investigadores por ser causantes de enfermedades; hoy no sólo se los estudia desde este punto de vista sino muy especialmente desde el punto de vista genético y de sus estructuras macromoleculares.

Los virus genéticamente mejor estudiados son los bacteriófagos (virus que atacan a bacterias). Esto se debe a su organización relativamente simple, a su capacidad de recombinación, y a las técnicas especiales que permiten determinaciones cuantitativas precisas. Se los estudia con el objeto de esclarecer cómo se transmiten los caracteres hereditarios y cuál es la estructura de la sustancia portadora de los mismos.

El presente trabajo tiene por objeto estudiar los efectos biológicos de la desaminación producida por el ácido de nitroso en el material genético de bacteriófagos.

El virus mosaico del tabaco (VMT) es el mejor conocido estructural y químicamente. Sin embargo es menos apto para ciertos estudios de genética; no da lugar a recombinaciones y presenta mayores dificultades técnicas para determinaciones cuantitativas precisas.

MORFOLOGIA

Los bacteriófagos observados al microscopio electrónico presentan una conformación característica, que en líneas generales es similar en todos ellos.

Se observa una cabeza de forma esférica, cilíndrica o polidábrica y una cola o apéndice de longitud variable según el tipo de fago (1.1).

Exteriormente llevan una envoltura de proteína de composición y estructura diferentes según la región que se considere. En su interior la cabeza contiene ácido desoxirribonucleico, polinucleótido distinto y característico para cada tipo de fago.

Cada partícula vírica (fago) está constituido por partes aproximadamente iguales de proteína y ácido desoxirribonucleico (ADN) y pequeñas partes de lípidos (Kosloff) que pueden considerarse material de contaminación de la bacteria en la cual crecieron (Adams p.88).

La cola se compone de una envoltura proteica y un eje central recorrido en toda su longitud por un conducto tubular. El extremo de la cola suele tener un ensanchamiento unido a ramificaciones fibrilares que poseen un elevado grado de especificidad respecto de las estructuras de la membrana bacteriana (Brenner). Esta posee receptores especiales para la adsorción de cada tipo de fago (Weidel 1953 y 1961).

Cuando los fagos T-pares son tratados con H_2O_2 se observa mejor la estructura de la cola debido a la contracción de la vaina proteica de la misma (Fig.1) que adhiera por un extremo a la cabeza y por el otro presenta unas fibras delgadas que sirven a la adsorción (Gunsalus) y que miden unos 1300 A

de largo por 25 a 60 de espesor (Anfinsen); normalmente se hallan enrolladas en el eje central.

El conducto tubular mide alrededor de 1000 Å de largo y 80 de diámetro y permite el paso del ADN (de 25 Å de espesor) cuando este es inyectado en la bacteria (Gunsberg).

Cada bacteria presenta varios centenares de recepturas características y generalmente distintas para cada tipo de fago. Este es el caso de *Escherichia Coli* que es susceptible a diversos tipos de fagos. Los receptores de T5 son esferas de 200 Å de diámetro compuestas de lico-glicoproteína.

Después de la adsorción el fago destruye las diversas capas de la pared bacteriana perforándola. Cuando cerca de un centenar de fagos son adsorbidos sobre la bacteria ésta puede lizar por daños en la membrana.

Los fagostambidos se adhieren a preparados de membranas bacterianas despojadas de citoplasma; a la adsorción sigue la inyección del ADN del fago que normalmente penetra a la bacteria y que en este caso pasa al medio.

El alto grado de especificidad que presentan los fagos respecto de las bacterias es empleado para tipificarlas; no se conoce procedimiento más eficiente en la epidemiología, dado que diversas bacterias que corresponden al mismo grupo serológico pueden ser distinguidas debido a que son susceptibles a fagos distintos (Anderson).

DIMENSIONES

Por diversos métodos se han determinado las dimensiones. Si bien los métodos poseen errores que son muy difíciles de eliminar existe una relativa concordancia.

Unidad de Medida: A

Bacteriófagos que atacan la cepa Escherichia Coli B

(Adams; Gunsalus - Steiner)

Fago	Método Empleado	Difusión	Rayos X	Microscopía electrónica		Tamaño placa	Serológicos te similares
	Centrifugación			Cadena	Cola		
T ₁	--	--	380	500	100 x 1600	med.	
T ₂	540	1070	580	900x600	200 x 1000	peq.	T4 T6
T ₃	--	360	--	450	100 x 100	grande	T7
T ₄	--	550	580	900x600	200 x 1000	peq.	T2 T6
T ₅	450	--	--	650	100 x 1700	peq.	
T ₆	540	940	580	900x600	200 x 1000	peq.	T2 T4
T ₇	450	--	380	450	100 x 100	grande	T3

Por sedimentación y difusión se determinó el peso seco del fago T₂: $3,3 \cdot 10^{-16}$ gr. (Taylor Epstein Lauffer 1955).

Peso seco estimado similar al de T₆

Los mismos autores determinaron el peso húmedo de T₂ por sedimentación en un gradiente de sacarosa; encontraron una densidad de 1,27 y un contenido de agua de 37,7 % de donde resulta para la partícula un peso de $5,3 \cdot 10^{-16}$ gr. y un diámetro esférico de 920 A. (Adams),

De acuerdo con la Treffertheorie se puede calcular el volumen sensible de virus o bacterias estudiando el efecto de las radiaciones ionizantes.

Para virus pequeños el volumen así determinado coincide aproximadamente con el que se obtiene por otros métodos, en cambio, para virus mayores resulta un tamaño menor que el verdadero. Esto se debe a que los virus más grandes presentan zonas de muy diversa sensibilidad a las radiaciones y seguramente sólo algunas de éstas zonas son esenciales para la reproducción del virus (Adams).

Al igual que las demás radiaciones, la luz ultravioleta produce también la inactivación del fago; pero los cuantos de luz son absorbidos selectivamente por diversas estructuras, de manera que este tipo de radiación no se presta para determinar el volumen del fago.

CONSTITUCION INTERNA

Suspendiendo los fagos T-pares (2,4,6,) en solución salina concentrada y diluyendo rápidamente en agua (shock osmótico) los fagos pierden su carácter infeccioso; la viscosidad de la solución aumenta debido a que el ácido nucleico escapa al exterior apareciendo al microscopio electrónico como filamentos de unos 20 Å de espesor. Las envolturas proteicas persisten relativamente intactas (Adams p.37 Gunsalus y Stanier).

El mismo efecto se logra con los fagos T-pares cuando se suspenden en solución concentrada de sacarosa, sea cual fuere la rapidez de la dilución.

Los fagos T-impares no caen al shock osmótico. T-5 pierde su ADN a temperaturas elevadas o bien en soluciones pobres en Ca^{++} . Se supone que estos iones son esenciales pa

ra conservar la integridad de la membrana dado que son imprescindibles durante la infección y multiplicación del fago T5 en E.Coli B.

Experiencias realizadas marcando con P³² el ADN del fago permiten asegurar que sólo el 40% del ADN queda en el interior del fago después del shock; no obstante adsorbe en la bacteria y la mata o bien la destruye sin producir nuevas partículas víricas. Los fagos temperados en las mismas condiciones adsorben pero no destruyen la bacteria. (Adams p.60)

CLASIFICACION DE BACTERIOFAGOS

De acuerdo con las bacterias que atacan, los bacteriófagos suelen clasificarse en: fagos típicos, estérilofagos y colifagos. Dentro de cada grupo se los individualiza mediante letras o números. Así por ejemplo los colifagos se designan T1, T2,T7. Pertenecen a una colección realizada por Demerec y Fano en 1945 y poseen la propiedad de atacar la cepa B de Escherichia Coli (Adams p.11).

Se los ha estudiado intensivamente desde los más diversos puntos de vista y han resultado sistemceptos para estudios de Genética y de estructuras macromoleculares. Los trabajos de Benzer sobre la estructura fina del material genético de T4 han permitido un conocimiento muy detallado del genómico de este fago.

La serie de fagos T puede subdividirse en cuatro grupos atendiendo a sus semejanzas morfológicas y a su parentesco serológico a saber:

T2, T4, T6 ; T3, T7 ; T1 ; T5 (Dentro de cada grupo no se

los pueden distinguir mediante el microscopio electrónico).

Los fagos que constituyen el grupo T-par (T2, T4, T6) son muy similares por su estructura genética, su especificidad respecto de la bacterias, y por el tipo de placa que dan cuando se emplean las técnicas habituales.

Estructuras Macromoleculares

Son parte constitutiva esencial de todos los seres vivos. Están formadas por subunidades de sustancias orgánicas, cuya secuencia y uniones determinan en cada caso el tipo y las características de la macromolécula.

Su peso molecular alcanza o pasa de 10.000 y consta por consiguiente de más de 1.500 átomos agrupados en monómeros (Egan).

Pueden citarse como ejemplo de macromoléculas, las proteínas, los ácidos nucleicos y las fibras de celulosa. Es frecuente encontrar pesos moleculares del orden de 10^6 , pudiendo alcanzar hasta 10^9 .

Dada su extraordinaria importancia en la conformación, el crecimiento y la reproducción de los seres vivos se las ha estudiado detenidamente en los más diversos sistemas. Al buscar una mayor simplicidad en éstos últimos (virus, bacterias, principios de transformación) se pretende esclarecer fenómenos que por generalización o por analogía permitan obtener conclusiones válidas, al menos en parte, para sistemas de mayor complejidad (célula, tejidos, seres organizados).

Las nucleoproteínas constituyen estructuralmente la base de todos los fenómenos vitales y en ellas reside la especificidad de muchas funciones y de la constitución celular.

Ácidos nucleicos

Existen dos clases de ácidos nucleicos el ribonucleico y el desoxirribonucleico. Este se encuentra en el núcleo de la célula (cromosomas) mientras el primero se encuentra en el núcleo y en el citoplasma (ribosomas).

Ácidos nucleicos

Las unidades constitutivas de ambos son los nucleótidos, razón por la cual los ácidos nucleicos son llamados también polinucleótidos.

Cada uno de estos está formado por una base orgánica, un azúcar (ribosa para el ribonucleico y desoxirribosa para el desoxirribonucleico) y ácido fosfórico (Haas).

Las bases del ácido ribonucleico (ARN) son derivados de la pirimidina y de la purina; son ellas

citocina (2-oxi-6-amino-pirimidina)

uracilo (2,6-dioxipirimidina)

adenina (6-aminopurina)

guanina (2-amino-6-hidroxipurina).

En el ácido desoxirribonucleico (ADN) aparece en lugar de uracilo timina (2,6-dioxi-5-metil-pirimidina) además de las restantes bases mencionadas para el ARN (Haas)

Ácido Desoxirribonucleico (ADN) Modelo estructural de Watson y Crick

Estudiando mediante difracción de rayos X las estructuras fibrilares del ADN, Rosalind Franklin y R.G. Goslin (1953) encontraron la forma cristalina A con aproximadamente un 30% de agua y otra B de mayor longitud y más hidratada. Postularon la posibilidad de una doble cadena helicoidal de nucleótidos desechando el modelo de triple cadena que había sido previamente propuesto.

Por confrontación de propiedades físicas y químicas propusieron que el átomo de P debía ocupar el borde exterior de la cadena, hallándose a 10 Å del eje de la hélice.

Watson y Crick (1953) propusieron un modelo estructural para la forma cristalina B según el cual ambas cadenas se

tán regularmente dispuestas una respecto de la otra, enrolladas respecto de un eje común y unidas por sus bases orgánicas mediante puentes transversales de hidrógeno.

La distancia entre dos nucleótidos consecutivos es de 3,4 Å en la dirección de la fibra. Cada 10 de estos intervalos la fibra completa un giro; el paso resulta así de unos 34 Å.

Las uniones glucosídicas (unión azúcar y base) están distribuidas regularmente en el espacio, de tal manera que las dos uniones glucosídicas que se encuentran a un mismo nivel de la hélice, (es decir, que pertenezcan una a cada cadena) deben hallarse a distancias fijas. De aquí resulta la consecuencia estequiométrica de que cada par de bases debe estar compuesto por una base pirímica y una base pirimidica.

Ninguna condición restrictiva se impone a la secuencia de las bases, dado que son planas, se encuentran en un plano perpendicular al eje de la hélice y se superponen espacialmente como apiladas.

Ambas cadenas son complementarias; conocida la secuencia de las bases en una de ellas queda determinada la secuencia en la otra. En esta idea se basa también el mecanismo de replicación propuesto por Watson y Crick y que presupone la separación de ambas cadenas y la duplicación de cada una de las dos cadenas complementarias.

El ácido desoxirribonucleico en bacteriófagos

Al igual que en el ADN de otros sistemas los fagos contienen adenina en cantidad equivalente con timina y guanina en cantidad equivalente con citosina (Anderson).

Fases en el ciclo vital del bacteriófago

Fase infecciosa (mature)

Una suspensión de fagos purificada y mantenida en buffer o en caldo nutritivo se manifiesta metabólicamente inerte; posee en potencia su capacidad de infección y de reproducción.

Los caracteres morfológicos y constitutivos descritos corresponden a esta fase.

Fase vegetativa

Si el fago de la fase infecciosa se pone en contacto con una suspensión de bacterias (específicas para cada tipo de fago) adsorbe a la membrana e infecta a la bacteria. Comienza con esto la fase vegetativa del fago que implica: 1°) la pérdida de su carácter infeccioso y 2°) su proceso de reproducción (Doermann).

Una experiencia de conclusiones muy interesantes han realizado Hershey y Chase (1952). Como la proteína contiene azufre se hacen crecer fagos en un medio que contiene S radiactivo, por otra parte se preparan fagos con fósforo radiactivo dado que éste elemento forma parte del ADN.

Se incuban separadamente ambas preparaciones de fagos con bacterias permitiendo la adsorción. Posteriormente se rompen las uniones fago-bacteria mediante una violenta agitación y se centrifuga para producir la sedimentación de las bacterias con los resultados siguientes: en el preparado que contenía fagos con proteína marcada, la actividad que dá en el sobrenadante (que contiene los fagos) en el preparado con fósforo radiactivo éste sedimenta junto con las bacterias.

De estos resultados se infiere que el ácido nucleico del fago penetra en la bacteria después de la adsorción y precipita con ésta. La envoltura proteica del fago que fuera separada de la bacteria por agitación queda en el sobrenadante, es decir, queda fuera de la bacteria durante la adsorción y la infección.

Después de la inyección del ADN en la bacteria, ésta sufre cambios fundamentales: ya no produce sustancias según su metabolismo normal sino que forma otras y principalmente multiplica el ADN del fago y las envolturas proteicas del mismo; por último libera poniendo en libertad uno o varios centenares de fagos los que a su vez atacarán a nuevas bacterias hasta lizar todo el cultivo, lo que se pone de manifiesto al desaparecer la turbidez del mismo.

De diversas experiencias concordantes con la anterior se puede inferir que el ácido nucleico es portador de la información genética transmitida por cada virus a su descendencia.

Las sucesivas transformaciones que sufre el sistema fago-bacteria después de la infección han sido detenidamente estudiadas mediante interrupción de la bacteria a intervalos posteriores de la infección.

Cambios que se operan en el sistema fago-bacteria después de la infección.

Después de la infección y a intervalos de varios minutos, se provoca artificialmente la interrupción de la bacteria mediante vibración ultrasónica o cizure con el objeto de estudiar la interacción fago-bacteria a la luz de las transformaciones químicas que sufre la bacteria infectada y

que junto con el ADN del fago recibió una pequeña cantidad de proteína soluble polipeptídica y poliaminas.

Período de eclipse

Representa la primera mitad del ciclo intracelular del fago (Deermann).

Inmediatamente después de la infección y por espacio de los primeros quince a veinte minutos el fago pierde su capacidad infecciosa, es decir, reemplazando la bacteria para liberar su contenido, no se observa actividad viral en el medio aún cuando cada bacteria hubiese sido atacada por más de 10 fagos simultáneamente. Razón por la cual este lapso se llama período de eclipse.

Después de unos veinte minutos reaparecen los fagos al estado infeccioso aumentando rápidamente su número hasta lograr un título 20 a 100 veces mayor que el inicial. Su velocidad de formación decrece al acercarse al instante de lisis.

Se denomina período latente al intervalo que media entre la adsorción y la reaparición del estado infeccioso por efecto de la lisis espontánea (Adams p.426).

Se admite que en el proceso de formación de fagos se multiplica primero el ADN y a medida que este proceso avanza comienza la formación de las vainas proteicas alrededor del ácido nucleico (Hershey 1953).

Morfología de fagos incompletos

Hacia el final del período de eclipse comienzan a aparecer ciertas formas de discos similares a cabezas de fagos

..//

vacías y formas cilíndricas parecidas a las celas. Ambas se observan al microscopio electrónico y se interpretan como precursoras de los fagos infecciosos (Stent 1959). Su número aumenta progresivamente hasta un máximo de 35 por bacteria y aparecen junto a fagos intactos al estado infeccioso cuyo número llega hasta 100.

Las formas anulares que también aparecen se atribuyen a efectos de la tensión superficial considerándose análogas a las descritas antes.

Algunos autores los consideran malformaciones dado que es difícil explicar como el ADN se introduce en la vaina proteica preformada.

Análisis químico de la fase vegetativa

Bloqueando con cloranfenicol los primeros 5 minutos la formación de proteína precursora del fago no se forma descendencia de éste. Esto parece indicar una estrecha dependencia del ADN con la proteína en el instante inicial de la reproducción. En cambio, si una vez comenzada la síntesis del ADN se la bloquea con luz ultravioleta, (dado que esta radiación es mucho más específica para ácidos nucleicos que para la proteína), la síntesis de la proteína continúa.

La síntesis del ADN del huésped disminuye al 1/3 de lo normal; al cabo del 6° minuto comienza a sintetizar ADN relacionado con la infección, pero distinto del ADN bacteriano normal; difiere de éste en la composición de sus bases y en que posee un rápido "turn-over" metabólico contrariamente al de las células no infectadas, de donde se desprende que esta sustancia es característica de la fase vegetativa.

A los ocho minutos comienza a sintetizar ADN precursor del fago y también a transformar el ADN de la bacteria en ADN tipo fago.

Lisis

Si se produce artificialmente la rotura de las bacterias al final del período de eclipse se comprueba que hay sintetizado ADN equivalente a 50 fagos. Simultáneamente se forman envolturas de proteína específicas del fago.

Cuando la célula lisa no todo el contenido de sustancias formadas integra las partículas víricas: se liberan además de éstas.

20 unidades ADN tipo fago

20 unidades antígeno fago.

10 unidades ADN diferente del ADN huésped.

La lisis se produce como consecuencia de un solapamiento de la bacteria y no por una completa "maduración" de los fagos.

Comparación del ciclo vegetativo de fagos T-pares y T7.

Es fácil detectar la formación del ADN en los colifagos T2, T4 y T6, dado que contienen 5 hidroximetilcitosina (5HMC) componente que no forma parte de la bacteria (Kouloff).

Proveniencia. Menos de una tercera parte del ADN de fagos T-pares tiene origen en el ADN de la bacteria que se despolimeriza para unirse con la 5HMC. El resto del ADN proviene del medio.

Una pequeña parte de proteína lábil proviene de la bacteria y la mayor parte del medio como se ha podido comprobar empleando N¹⁵ y C¹⁴.

Mediante el empleo de P³² para marcar el ADN se observa que, en el caso del fago T7 el 60 a 90 % del ADN viral proviene de la bacteria y el resto del medio.

Esta afirmación se ve apoyada por las siguientes observaciones:

1°. Después de la infección con T7 la célula manifiesta una o muy escasa síntesis de ADN.

La célula contiene ADN en cantidad que equivale a 150 fagos T7 y en cada lisis bacteriana se liberan de 100 a 120 fagos.

2°. Marcando con P³² las bacterias que luego se infectan con fago T7 en un medio libre de isótopos se comprueba que la mayor parte del P³² de la célula pasa al fago.

3°. La célula contribuye con cantidades equivalentes de N y P a la formación del fago; lo que sugiere la transferencia de nucleótidos o polinucleótidos de la bacteria al fago.

El N de la proteína vírica proviene de la proteína bacteriana. El ADN del T7 está formado por 4 bases idénticas a las de la bacteria, dado que el T7 no contiene la base pirimidica hidroximetilcitosina que es característica de los fagos T2, T4 y T6 (Kozloff).

Factores químicos en la síntesis ADN.

Teniendo en cuenta que el fago obtiene su propia ADN sintetizándolo en parte y despolimerizando el ADN de la bacteria habrá que suponer la presencia de DNasa que es la única enzima conocida capaz de despolimerizar el ADN.

Los medios que contienen bacterias lisadas presentan actividad enzimática de DNasa, mientras que los cultivos de

bacterias no infectadas no poseen tal propiedad (Kozloff)
Esto hace pensar en la posibilidad de un inhibidor porque
la actividad de la Hnasa se inhibe al agregarle extracto
de bacterias no infectadas.

El inhibidor es igualmente eficaz para impedir la
despolimerización con Hnasa de ARN de timo y de virus.

Los extractos de bacterias E.Coli pueden ser her-
vidos, dializados y tratados con cianuro sin que por e-
llo se pierda la actividad del inhibidor; se ha comprobado
que ésta es un ácido ribonucleico; tratándolo con Hnasa se
inactiva apareciendo consiguientemente la actividad de la
Hnasa (Kozloff).

Fase provirus

Hasta aquí se describió el ciclo vital de los fagos llamados virulentos dado que al ataque a una bacteria se sigue su destrucción con liberación de nuevos fagos.

Existen además de éstos los fagos "temperados" cuya adsorción e infección puede tener una de dos respuestas. 1º. ciclo vegetativo del fago y lisis de la bacteria. 2º. la bacteria se vuelve lisógena transmitiendo esta propiedad a su descendencia (Anderson).

En éste último caso el material genético inyectado por el fago no altera aparentemente a la bacteria sino que se opera una "simbiosis genética" en la cual el genoma del fago o parte de éste adhiere a un determinado locus del organismo bacteriano en forma de provirus.

Una bacteria contiene provirus si ella y su descendencia posee la propiedad de liberar partículas víricas cuando es sometida a condiciones especiales, por ejemplo, a radiación ultravioleta o a agentes químicos adecuados (Delbrück N.), de esta manera se induce en ellas el pasaje de la fase provirus a la fase vegetativa y de ésta a la infecciosa.

Las cepas de bacterias que poseen tal propiedad se llaman lisógenas para el fago que llevan al estado de provirus. Así por ejemplo la cepa *Escherichia Coli* K 12 es lisógena para el fago λ .

Normalmente los cultivos de bacterias lisógenas no dan origen a fagos al estado infeccioso y son resistentes a una reinfección del mismo fago. Hay similitud entre un provirus y un gen porque ambos confieren a la célula una deter-

minada propiedad o capacidad potencial. Además gen y provirus poseen la propiedad de autorreduplicarse sincrónicamente con el resto del material genético. En condiciones especiales, (por inducción), el provirus puede multiplicarse independientemente del resto del material genético.

Treffertheorie

La "Treffertheorie" o "target theory" tuvo su origen en los estudios realizados sobre los efectos biológicos de las radiaciones.

En lo que sigue más adelante se aplican las conclusiones de esta teoría, razón por la cual se exponen aquí brevemente sus fundamentos.

Demmeier trata de explicar qué fenómenos acontecen desde el instante en que la radiación de determinada frecuencia incide sobre una célula hasta la alteración o bien la muerte de ésta.

Observa que la absorción de energía en un tejido irradiado con rayos X es muy reducida, no obstante los efectos biológicos resultan muy importantes. Los explica admitiendo que la radiación produce un considerable aumento de temperatura en "zonas puntuales", que sufren graves alteraciones biológicas a causa del mismo, dado que la transmisión del calor a regiones vecinas requiere un cierto tiempo hasta lograr el equilibrio térmico. (La cantidad de calor producida en todo el tejido no es medible por ser demasiado reducida).

Los efectos biológicos de las radiaciones pueden provenir de ionizaciones producidas en determinadas moléculas, como en el caso de mutación de genes, o bien, del pasaje de la radiación ionizante a través de determinadas estructuras como en el caso de las roturas y aberraciones de cromosomas (Lee).

Se denomina "target" a la molécula o estructura susceptible al efecto de la radiación; el volumen correspondiente se llama volumen sensible y al efecto, alteración e ioni-

acción que le acontece se denomina "Treffer", "hit" o "impacto".

El modelo resulta adecuado y la teoría tuvo éxito en los casos en que la radiación produce ionización en la molécula o estructura considerada o en su inmediata vecindad (unas pocas milimicras), se da este caso en la inactivación de virus y de bacterias e inducción de mutantes por efecto de la radiación sobre el material genético (Lee).

Los fundamentos matemáticos de la teoría fueron desarrollados por M. Klem y K. Altshuler.

Consideremos S_0 moléculas sensibles sometidas a la radiación durante el tiempo t .

La disminución de las que no fueron dañadas por ningún impacto durante el lapso dt es proporcional a dicho lapso, a la cantidad S de las que no habían sufrido impacto eficaz anterior al mismo, y a k coeficiente de sensibilidad que depende de la radiación empleada.

Resulta

$$dS = -S_0 k dt$$

Integrando resulta la expresión que da el número de moléculas que al cabo del tiempo t no fueron dañadas por ningún impacto

$$S = S_0 e^{-kt} \quad (1)$$

con S_0 : partículas presentes al instante $t=0$

El número de moléculas que fueron alcanzadas una o más veces será

$$S_{1,2,\dots} = S_0 - S = S_0 (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

las que fueron alcanzadas una sola vez son:

$$dS_1 = -kS_1 dt + kS dt$$

De donde resulta la ecuación diferencial:

$$\frac{dS_1}{dt} + k S_1 = k S_0 e^{-kt} = 0$$

que tiene por solución la función

$$S_1 = e^{-kt} (A+Bt)$$

reemplazando en la anterior resulta $B = kS_0$; $A = 0$

obteniéndose $S_1 = S_0 k t e^{-kt}$

En general el número de moléculas almacenadas por uno más impactos (es decir, que por lo menos fueron almacenadas n veces) está dado por la expresión:

$$S_n = S_0 \cdot \left[1 - e^{-kt} \left(1 + kt + \frac{(kt)^2}{2!} + \dots + \frac{(kt)^{n-1}}{(n-1)!} \right) \right]$$

De esta expresión se obtienen diversas curvas según sea el valor adoptado para n ; ($n = 1, 2, 3, \dots$). En el caso $n = 1$ resulta la expresión (2).

Por comparación con el tipo de curva que se obtiene experimentalmente se puede determinar el número de impactos requeridos por el sistema considerado para producir el efecto biológico estudiado (inactivación, mutación, efecto sobre enzimas, etc.).

Para que el efecto se pueda atribuir a un sólo impacto, tratándose de microorganismos, se requiere:

1°) Que la curva de supervivencia en función de la dosis sea una exponencial.

2°) Que el efecto no varíe con la intensidad de la dosis, es decir, que sea independiente del tiempo durante el cual se la suministra.

En el caso de inactivación de bacterias o de virus, cuando la dosis es pequeña y el número de individuos es muy elevado, de tal manera que sólo una pequeña cantidad de e-

llos es afectada por la radiación, la curva de inactivación en función de la dosis resulta una recta (Lea).

Cuando se da la primera de estas dos condiciones resulta que a cada incremento fijo de la dosis "mueren" la misma proporción de individuos expuestos inicialmente a la misma. El número de supervivientes decrece en progresión geométrica; la curva de supervivencia es una exponencial; se denomina D_0 "dosis de inactivación" o "dosis del 37 %" o "dosis letal media" a la dosis que produce en promedio un impacto por organismo (Lea H.A.).

Forma de determinar la dosis del 37 %

1º: se representa en escala semilogarítmica la fracción de supervivientes $\frac{N}{N_0} = e^{-kt}$ en función de la dosis obteniéndose una recta

$$\text{Para el caso } kt=1 \text{ es } \frac{N}{N_0} = e^{-1} = 0,368$$

De allí resulta D_0 la dosis que ocasiona el 0,37 de supervivencia.

2º: Si se representan los organismos inactivados en función de la dosis resulta como dosis de inactivación la que afecta al 63,2% de los organismos debido a que $1 - e^{-1} = 0,632$.

Si el efecto de inactivación de un virus fuese consecuencia de un conjunto de impactos (efecto acumulativo) la curva de supervivencia debería presentar un aspecto como el de fig.1.

La fig. 2 representa una exponencial; se obtiene si cada inactivación es consecuencia de un evento singular (impacto en el volumen sensible).

Resultan análogas conclusiones aplicando la fórmula de Poisson del cálculo de probabilidades.

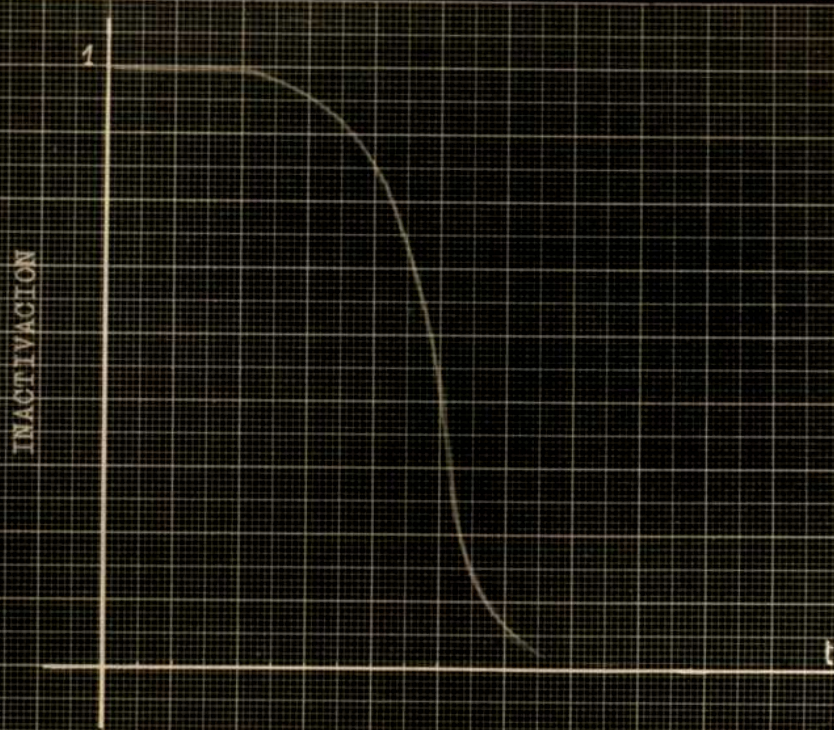


Fig. 1

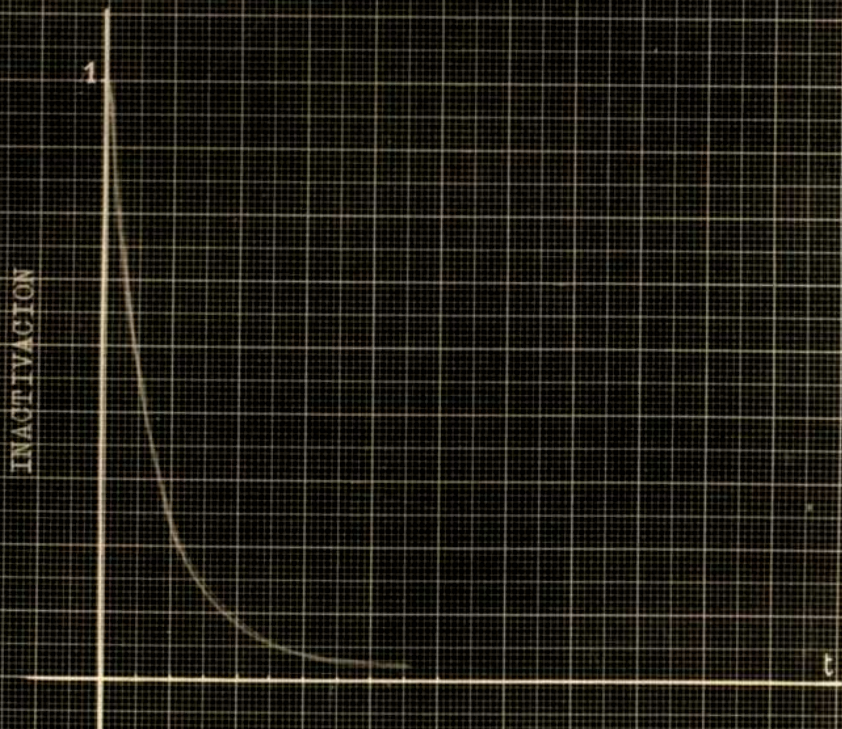


Fig. 2

$$P(n) = \frac{e^{-IV} (IV)^n}{n!}$$

donde I: Eventos inactivos por unidad de volumen distribuidos al azar.

V: volumen sensible que pueda interceptar uno de estos eventos.

IV: Promedio de eventos en el volumen V.

La probabilidad de que 0,1,2,3... eventos tengan lugar en dicho volumen es

$$P(0) = e^{-IV}$$

$$P(1) = e^{-IV} \cdot IV, \text{ etc.}$$

$$P(2) = \frac{e^{-IV} (IV)^2}{2!}$$

Los eventos son mutuamente excluyentes de manera que cumplen

$$\sum P(n) = 1$$

Radiobiología

Efecto de las radiaciones en bacteriófagos.

Las ultravioleta

La luz ultravioleta emitida por una lámpara de vapores de mercurio emite radiación para la cual la proteína es relativamente transparente siendo absorbida en su mayor parte por el ADN (20.7)(20.8)(20.9).

Las curvas de inactivación siguen la ley

$$\frac{N}{N_0} = e^{-k_1 D}$$

con N_0 fagos activos inicialmente

N " " después de la dosis D

k_1 constante característica para cada tipo de fagos y que depende de las condiciones en que se irradian.

Cuando se aplican dosis iguales en n intervalos de tiempo iguales (D es proporcional al tiempo durante el cual se aplica) resulta:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-k_2 t}$$

donde k_2 depende de k_1 y de la intensidad de la dosis.

**Investigaciones y estudios virales cuyos resultados con-
ducen a mejorar el presente trabajo.**

El virus mosaico del tabaco es posiblemente el mejor conocido estructuralmente y el más minuciosamente estudiado.

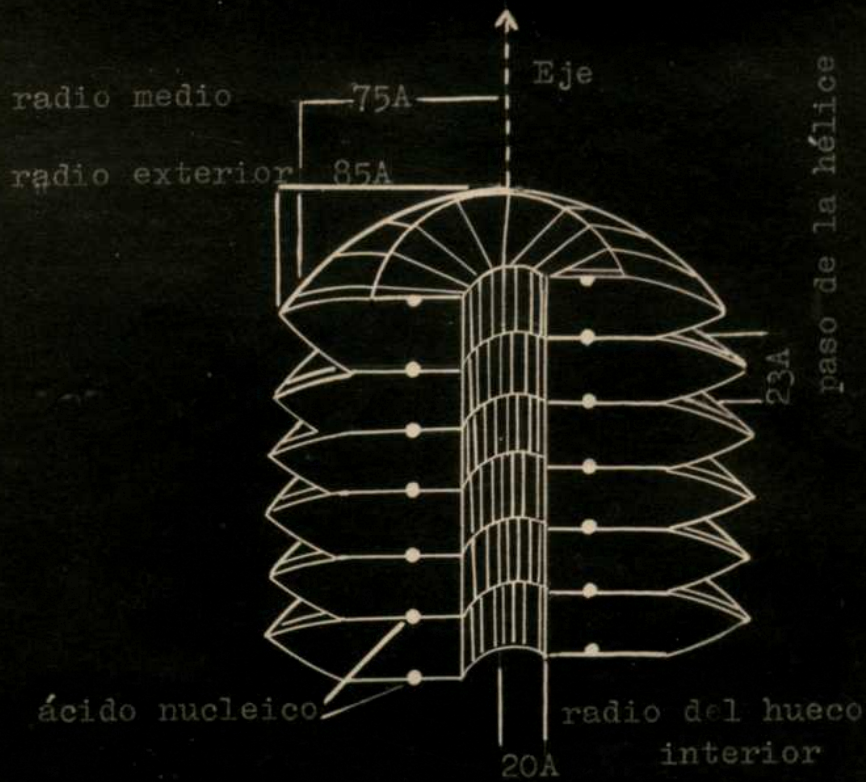
Tiene forma de un cilindro hueco de proteína de 3000 Å de longitud y un diámetro exterior de 170 Å (Schramm G 1958; Fernandez Morán H. y Schramm G, 1958). Consta de subunidades de peso molecular comprendido entre 17.000 y 18.000 (Fraenkelin 1957). Este cilindro de proteína soporta una hélice longitudinal de nucleótidos cuyas espiras se enroscan en el espesor de la pared proteica (Ragnum) Compuesta de 157 ^{a.ácidos} _(1.2)

Los 6000 nucleótidos de la estructura unidos en cadena helicoidal simple, forman la macromolécula de ácido ribonucleico (ARN) cuyo peso molecular es de $2,2 \cdot 10^6$. (Gierer A. 1958 a).

El peso molecular total de la partícula virica se calcula en $40 \cdot 10^6$ del cual el 5,6 % corresponde al ARN (Schramm G. 1958).

Los conocimientos del virus se basan en estudios químicos, en observaciones con el microscopio electrónico y especialmente en los estudios de Rosalind Franklin y col. (1957), mediante difracción de rayos X concebieron el modelo estructural del virus mosaico del tabaco (VMT).

En el año 1955 Schramm y col. comprobaban que separando parte de la proteína del virus éste conserva en carácter infeccioso. Posteriormente Gierer y Schramm (1956) y Gierer (1957) consiguieron probar que una vez separada toda la proteína por el método del furoil, el ácido ARN es capaz de engendrar nuevas partículas viricas iguales a las originarias. Aplicando convenientemente el ARN sobre las hojas del



Modelo estructural del virus mosaico del tabaco según R.E. Franklin

Esquema

tabaco, el virus se regenera, se multiplica e infecta a toda la planta.

Fraenkel-Conrat (1956) logró comprobar que aún sustituyendo la proteína por otra diferente, el AEN del virus conserva la actividad biológica citada.

Con diversas experiencias se fundamentó la afirmación de Gierer y Schramm:

1° El AEN contiene menos del 0,02% de proteína, es decir, una proporción que ya no puede ser detectada por métodos químicos.

2° Tratando con anticueros al AEN éste no reduce su actividad mientras que aplicado al VHT éste se inactiva.

3° Con la enzima que despolimeriza el AEN (ribonucleasa) la actividad del AEN no reduce a cero pero no así la del VHT.

De los estudios anteriores se desprende la importancia del AEN como estructura portadora de la información genética traducida en su capacidad de sintetizar nuevo AEN y proteína que actuaría como vaina protectora frente a las agentes externos.

Se observó asimismo que el carácter infeccioso persiste a condición de conservar la integridad de la macromolécula de AEN. Toda despolimerización o degradación que destruya su integridad o disminuya su peso molecular trae por consecuencia la desaparición de sus propiedades biológicas. Tal es el caso cuando se rompen las uniones del ácido fosfórico con la enzima específica (RNasa). En promedio la rotura de uno sólo de estos puentes de fosfato produce la inactivación del virus (Gierer 1957).

Estos descubrimientos suscitaron la siguiente cues-

..//

tián: existirán regiones o zonas inertes en la cadena de polinucleótidos del ARN?

Suponiendo que hubiera nucleótidos que no contribuyen a la información genética debería poderse modificar una cierta proporción de los mismos sin que por ello se pierda su infeciosidad (Schuster H., Schramm G. 1958).

Para responder a estas cuestiones fué necesario idear un método que permitiera alterar al ARN sin destruir su integridad. El carácter lábil del ARN restringe las posibilidades de esta experiencia, dado que sus propiedades biológicas se pierden al cabo de 24 horas si se lo mantiene a 20° C, al igual que si se lo somete a valores extremos de PH.

Además fué necesario encontrar una reacción que condujera a productos de reacción bien definidos que se puedan determinar cuantitativamente.

Después de diversas experiencias de tanteo Schuster y Schramm estudiaron la desaminación del ARN con ácido nítrico. Los grupos amino son sustituidos por OH. De adenina, guanina y citosina se obtienen respectivamente los compuestos hipoxantina, xantina y uracilo. La hipoxantina y la xantina son compuestos nuevos que no forman parte de los ácidos nucleicos naturales. En cambio el uracilo que originariamente forma parte del ARN aumenta su proporción durante la reacción.

La desaminación se puede seguir cuantitativamente extrayendo muestras a diversos intervalos que luego se hidrolizadas permiten separar cromatográficamente las purinas y pirimidinas que intervienen en la reacción.

Las reacciones permiten alterar las bases del ARN sin romper en ningún punto la cadena de nucleótidos.

Sobre la base de estos trabajos previos se estudió el efecto del ácido nítrico sobre el VNF intacto y sobre el ADN del mismo virus extraído por el método del fenol comprobándose el efecto inactivante en ambos.

Posteriormente Mundry y Gierer (1958) probaron el efecto mutagénico del ácido nítrico sobre el material citado.

En el caso de la desaminación del ADN la formación de uracilo a partir de citosina puede ser causa de mutaciones. En cambio la aparición de hipoxantina y xantina (por desaminación de adenina y guanina) debe traer consigo la sustitución de aquellas por otras bases que normalmente forman parte del ADN; en estas sustituciones cabe la posibilidad de que la reduplicación no resulte idéntica a la original.

Dada la diferente estructura del ADN comparada con la del ARN, las conclusiones obtenidas para éste no pueden ser extendidas al ADN sin previo estudio del caso.

En el caso de ADN ninguno de los productos de desaminación forma parte normalmente del ADN. Además su conformación en doble cadena le otorga propiedades químicas y físicas de rigidez y estabilidad, de suerte que con la desaminación adquiere propiedades específicas. No se puede prever de antemano las consecuencias que esta reacción puede traer sobre el sistema biológico de que forma parte.

Elección de un sistema adecuado para el estudio de la desaminación en el ADN.

Por las razones aludidas fué necesario buscar un sistema tal que intervenga sólo ADN (sin ARN) y tal que los cr-

ganismos que lo contienen puedan obtenerse en poblaciones muy numerosas, además de ofrecer un medio adecuado de detectar el efecto sufrido por el sistema a causa de las alteraciones introducidas en sus macromoléculas.

Se eligieron los bacteriófagos de la serie T que responden a estas condiciones y entre ellos, el T2 ofrece mayores seguridades de que su material genético no sufre modificaciones por interacción con el de la bacteria. Si esto ocurriera las conclusiones podrían quedar oscurecidas o distorsionados los resultados.

Según se desprende de la experiencia de Hershey y Chase la información genética transmitida a la descendencia está contenida en la estructura macromolecular del ADN.

La reduplicación del ADN y la posterior síntesis de la proteína específica del fago dependen del mensaje cifrado transmitido por el ADN en la infección. La secuencia de las bases es de fundamental importancia en la información a transmitir. Cabe preguntarse en qué medida quedará alterado el mensaje por efecto de la desaminación de una o varias de dichas bases.

MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA REFINALES

Cultivo de bacterias

Una colonia de bacterias de la cepa *Escherichia Coli* se resuspende en caldo nutritivo. Para favorecer el cultivo de las bacterias conviene sacar el cultivo durante 12 a 18 horas a 37° C. Las bacterias se multiplican, pasan por la fase lagarítica de crecimiento y llegan a la saturación con un título aproximado de $5 \cdot 10^8$ bacterias por ml.

Obtención de bacteriifagos en suspensiones de concentración elevada

La suspensión saturada de bacterias se diluye 1/1000 en el volumen de caldo nutritivo que se destina a la obtención de un stock de fagos. Este cultivo al igual que el anterior se saca en las mismas condiciones de temperatura.

Las bacterias se multiplican a razón de una generación cada 20 minutos; la turbidez del líquido aumenta. Al cabo de dos o tres horas habrá de 10^8 a $5 \cdot 10^8$ bacterias/ml.

Se verificó la concentración de las mismas contando al microscopio mediante una cámara Thoma.

A continuación se infecta con fagos.

Cuando el volumen total no pasa de 500 ml. se infecta con virus provenientes de una sola placa, es decir, con fagos descendientes de una única partícula virica. Cada placa contiene de 10^7 a 10^9 fagos. Para volúmenes mayores se usan aprox. tantos fagos como bacterias cuenta el cultivo en el momento de la infección. De esta manera todas las bacterias son atacadas más o menos simultáneamente y cada una de ellas lleva pendiente en libertad a 100 a 300 fagos. Se logra un título final de 10^{10} a 10^{11} fagos por ml. Hay que contar siempre con pérdidas debidas a la adsorción de fagos en restos de membranas bacterianas.

Para fagos de lisis rápida (T1, T3, T7) es suficiente con infectar con un fago por cada 1000 bacterias.

Al cabo de unas tres horas (6 hrs. en el caso de los fagos T2, T4 y T6) se comienza a notar la paulatina desaparición de la turbidez debido a las bacterias que son lisadas hasta que el caldo recobra casi totalmente su transparencia primitiva. En éste momento la lisis es total y se puede proceder a la centrifugación. Eventualmente se puede estacionar en la heladera por un tiempo, incluso un par de días.

El procedimiento descrito es especialmente apropiado para la obtención de suspensiones de fagos genéticamente homogéneos.

Se ha empleado asimismo el método de Adams. Sumamente que consiste en inocular 10^5 a 10^6 fagos con bacterias sobre agar nutritivo y resuspendarlos con caldo después de obtenida la lisis confluyente. Se obtienen títulos comprendidos entre 10^{11} y 10^{12} fagos/ml.

Método de Gratia para la determinación del título de fagos y para la observación de la morfología de placas.

Técnicas especiales permiten detectar la presencia de cada uno de los fagos. Los datos cuantitativos así obtenidos fueron decisivos en los adelantos de esta rama de las investigaciones, dado que para otras clases de virus las técnicas son mucho más laboriosas y menos precisas.

Cada fago da origen a una placa claramente visible. La "eficiencia de placas", o sea, la relación entre fagos activos presentes, y placas obtenidas, es prácticamente igual a uno, cuando se emplea un medio nutritivo, un indicador adecuado que en este caso es *Escherichia Coli* y un tipo de virus de carácter virulento, como lo son los de la serie T.

El método de Gratia o del agar blando es, asimismo, más rápido que el de nebulización que consiste en proyectar los virus sobre el agar sembrado de bacterias.

Para obtener placas de una suspensión de fagos se plaquean dos o tres diluciones distintas tales que cubran el intervalo dentro del cual puede oscilar el título previsto; por ej.: para una suspensión que previsiblemente tenga entre 10^8 y 10^{10} fagos por ml se plaquean 0,1ml de las diluciones de orden 10^5 , 10^6 y 10^7 ; éstas deben ser tales que resulte un número conveniente de placas por caja. Si el número de placas es demasiado pequeño introducirá errores estadísticos en la determinación del título, si es demasiado elevado se produce lisis confluyente impidiendo el recuento de las placas.

Se trata que el número de placas T2 y T3 no exceda los 1000 y 300 fagos por caja respectivamente.

Para plaqueras se procede de la siguiente manera:

El agar nutritivo blando se funde y se distribuye a razón de 2,5cmj. en tubos Wassermann que se mantienen a 45 o 46°C; (esta temperatura permite mantenerlo fundido y no perjudica ni a las bacterias ni a los fagos) se agrega 0,1 ml (2 gotas) de una suspensión saturada fresca de E.Coli a cada tubo y luego 0,1 ml. de la dilución de fagos prevista; se mezcla y se vierte en la caja de petri que contiene una capa de agar nutritivo. Al cabo de unos minutos cuando el agar blando se ha enfriado se incuban a 37°. Después de unas horas comienzan a notarse las placas. Al cabo de 10 o 12 horas éstas aparecerán con su morfología y tamaño característicos.

Los fagos y las bacterias agregados al agar blando quedan esparcidos uniformemente sobre la superficie de la caja. Las bacterias crecen y al cabo de algunas horas forman una capa opaca sobre dicha superficie. En el lugar en que un fago se pone en contacto con una bacteria en crecimiento adsorbe en su membrana, después de infectarla y reproducirse la lisa liberando varios centenares de fagos que recomienzan el proceso con las bacterias vecinas; la lisis se extiende hasta formar una placa visible. La morfología de la misma dependerá en cada caso del tipo de fago de que se trata. El tamaño oscila entre uno o dos milímetros de diámetro en el caso de los fagos T2, T4 y T6, algo menos para T5 y unos 5 a 8mm. para T1, T3 y T7.

El crecimiento de las placas se detiene cuando las bacterias, por razones de nutrición y espacio lleguen al estado estacionario de su crecimiento en cuyo caso a la adsorción no sigue la lisis. Cada placa contiene de 10^7 a 10^9 partículas víricas (Adams 456).

Obtención de una suspensión de fagos con mayor grado de pureza.

Varias de las experiencias fueron realizadas con preparados de un mayor grado de pureza(23,2) para lograrlo se resuspenden los fagos sedimentados en buffer acético acetato (PH 4,5) con lo cual floculan los restos bacterianos al cabo de media hora. Después de repetir las dos centrifugaciones habituales se resuspenden los fagos en una cantidad de bufer T2 tal que resulta una concentración final de 10^{12} fagos por ml.

Las pérdidas del título debidas a este procedimiento son insignificantes. La suspensión de fagos que así se obtiene es transparente y presenta una opalescencia ligeramente azulada; en otros casos resulta amarillenta.

Los fagos así obtenidos pueden conservarse a bajas temperaturas (entre 0° y 4°C) durante meses y tal vez años sin alterar considerablemente su título(23,2).

III. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Inactivación de T2 mediante ácido nítrico.

Se comprobó que el ácido nítrico tiene sobre los bacteriófagos un marcado efecto inactivante. Se ha estudiado el proceso de inactivación con los bacteriófagos T2 (Vielmetter Wieder) y T3 que atacan a *Escherichia Coli B*, la cual por este motivo se usa como indicador.

Se requieren experiencias previas de tanteo para apreciar la magnitud del descenso del título al cabo de media o una hora. Con este dato se puede evaluar la concentración del nítrito de sodio más indicada y el descenso del título de fagos activos a intervalos regulares después de iniciada la reacción. Esto permite ajustar las hileras de dilución que convengan a cada instante.

DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA

Una suspensión de fagos de título elevado se pasa a buffer acético acetato (PH4,5) por dilución 1/50 de la suspensión neutra en el buffer indicado. Las suspensiones resultantes oscilaron entre 10^9 y 10^{10} fagos/ml.

Mediante el termostato se mantiene la temperatura a 20°C.

En el instante cero de la experiencia se agrega nítrito de sodio de tal manera que la concentración de éste en la suspensión de fagos resulte 0,10 molar. (En sucesivas experiencias se ha trabajado asimismo con las siguientes concentraciones molares: 0,3, 0,16, 0,10, 0,03. Los resultados figuran en las tablas de valores Nos.2, 3, 4, y 5 y en los gráficos respectivos).

A intervalos regulares de 5 o 10 minutos se extraen muestras que se diluyen en buffer de PH7 con lo cual queda bloqueada la reacción. La dilución a que se somete cada mueg

..//

tra varía desde 10^7 para el instante cero hasta 10^3 para la muestra extraída una hora más tarde.

Las diluciones que figuran en el cuadro de valores son previstas y ajustadas para cada intervalo; varían en cada experiencia con el título inicial de la suspensión de fagos, con la concentración de nitrito empleada y con la cantidad de placas que se desea obtener en cada caja. Un número de 400 a 800 placas/caja es óptimo para T2, pudiendo aún contarse perfectamente cuando son alrededor de 1500. Para el caso de T3 se procuró que su número no excediera de 300 placas/caja debido a la mayor superficie cubierta por cada placa.

Se plaquean como mínimo dos cajas de cada una de las diluciones más convenientes siguiendo el método de Gracia descrito anteriormente.

Después de incubar se cuentan las placas y se calculan los títulos instantáneos que corresponden a cada muestra extraída.

Denotando de N_0 el título inicial de fagos (para $T=0$)
y N el título instantáneo para el tiempo t
resulta N/N_0 inactivación, o sea, fracción de supervivientes.

Representando los valores de la fracción de supervivientes en función del tiempo de incubación de la muestra se obtiene una curva muy aproximadamente exponencial que representada en escala semilogarítmica da una recta que pasa por el punto uno (gráficas). Las rectas se determinaron por cuadrados mínimos.

Por consiguiente la reacción cumple la siguiente ley:

$$N/N_0 = e^{-kt} \quad 2.1$$

con k constante característica que depende del fago de la concentración de nitrito empleada y del PH.

Cuando i y k son iguales la fracción S/S_0 vale 0,368. De allí que se pueda definir a k como el tiempo necesario para que la concentración de fagos se reduzca al 37% de la concentración inicial.

Para la representación gráfica, el tiempo i se ha dividido por k ; k es el lapso durante el cual cada fago recibió en promedio un sólo impacto I .

Tratándose de un proceso exponencial y dada la linealidad de k para diferentes concentraciones de nitrito, se puede decir, de acuerdo con la "Traffertheorie" que basta un sólo impacto para producir la inactivación de una partícula virica.

El ácido nítrico produce un efecto de desaminación sobre las bases de los nucleótidos que forman el ácido desoxirribonucleico. Resulta así que cada desaminación es capaz de inactivar un fago.

De acuerdo con la fórmula de Poisson se pueden calcular los porcentajes de fagos alcanzados 0,1,2,... veces por el efecto del ácido nítrico cuando $I = \frac{i}{k} = 1,2,3,\dots$, o sea, para el instante en que en promedio cada fago fué alcanzado por uno, dos, o más impactos.

Así por ejemplo para el caso del primer impacto $I=1$ se tiene:

$$P_n = \frac{I^n e^{-I}}{n!} \quad \text{con } n=0,1,2,3,\dots$$

resulta $P(0) = 37\%$; $P(1) = 37\%$; $P(2) = 19\%$
 $P(3) = 6\%$

Controles

1°. Para descartar una posible influencia del buffer PH 4,5 y de otros eventuales factores, se realizó el siguiente control: Una suspensión de bacteriófagos T2 se incubó a

20° en las mismas condiciones de la experiencia anterior emitiendo únicamente el agregado de nitrito de sodio.

No se observó ningún descenso del título en el lapso de una o dos horas. Al cabo de uno o dos días el título inicial había disminuido en un 25%. Proporción despreciable comparada con la inactivación de 10^{-4} aprox. que produce el nitrito al cabo de una hora.

2°. Para descartar la posible influencia de pequetísimas cantidades de NO_2Na que pudieran ser arrastradas a lo largo de las diversas diluciones y que eventualmente podrían influir aún sobre la multiplicación de los fagos en el agar y al formar las placas, se agregaron cantidades equivalentes de NO_2Na a las hileras de dilución del control antes citadas, con los resultados mencionados, lo cual permite descartar estos posibles efectos.

INACTIVACION DE T2 CON UNO DE LOS O-OLIGONUCLEOTIDOS

(Tabla n° 2)

N°	TIEMPO (min.)	DILUCION TOTAL	N° DE PLACAS	TITULO S	FRACCION SUPERVIVIENTE
	0	10^7	306 308	$1,0 \cdot 10^9$ $3 \cdot 10^9$	1
	5	10^7	259 295	$2,3 \cdot 10^9$	$7,6 \cdot 10^{-2}$
	10	10^6 10^7	1968 1493 158 172	$1,6 \cdot 10^9$ $1,7 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^{-2}$
	15,15	10^6	734 826	$7,9 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^{-2}$
	20	10^6	429 422	$4,2 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^{-2}$
	40	10^6	178 206	$1,9 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^{-3}$
	50	10^5	779 744	$7,7 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^{-3}$
	60	10^5	292 285	$1,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^{-3}$

TRATAMIENTO DE LA SOLUCIÓN No. 2.10.10.12

(Tabla n° 3)

N°	TIEMPO (min.)	DILUCION TOTAL	N° DE PLACAS	TITULO	FRACCION SOBREVIVIENTE
	0	10^8	84 87	$8,5 \cdot 10^9$	1
	5	$0,5 \cdot 10^7$	1.264 1.253	$6,0 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^{-1}$
	10	10^6 10^8	Línea Línea 35 32	$3,4 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^{-1}$
	15,5	10^4 10^6	Línea Línea 400 405	$4,4 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^{-2}$
	20	10^4 10^6	Línea Línea 877 121	$3,0 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^{-2}$
	30	10^3 10^6	Línea Línea 75 60	$5,8 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^{-3}$
	60	10^1 10^5	Línea Línea 124 200	$3,0 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^{-3}$

INDICACIONES DE LOS NÚMOS DE LAS PLACAS

(Tabla nº 4)

Nº	TIEMPO (min.)	INDICACIONES TOTALES	Nº DE PLACAS	VOLUMEN	FRECUENCIA INDICATORIA
0		10^7	256 250	$2,5 \cdot 10^9$	1
5		10^7	24 20	$2,5 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
10		10^6	221 200	$6,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
		10^7	77 73		
		10^6	24 22 20 18		
15		10^6	130 120	$2,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
		10^6	173 157		
		10^5	20 20 19 17		
20		10^5	200 200	$2,5 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
		10^6	20 19 17		
		10^5	200 200 18 14		
25		10^5	1410 1410	$2,0 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^{-1}$
		10^5	120 117		
		10^4	102 173 18 13		
30		10^4	2700 2730	$2,7 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^{-1}$
		10^5	100 100		
		10^4	130 120		
35		10^3	1410 1410	$2,0 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^{-1}$
		10^3	225 217		
		10^2	20 18		

2-

0	10 ²	1400		
	10 ³	1400		
		40		
		40	4-20-05	2-6-20-4

- ● - ● - ● - ● - ● - ● - ● -

REGISTRO DE LAS MEDICIONES DE LAS PLACAS DE LAS CASAS

Nº DE CASA	TIEMPO	MEASURA TOTAL	Nº DE PLACAS	TIEMPO	2/30
1	0	10^7	139		
2		.	142		
3		.	114	$1,3 \cdot 10^9$	1
3	11° $22' \cdot 10^{-10}$	10^4	124		
4		10^4	128	$1,2 \cdot 10^7$	
5		10^6	14		
6		.	14		10^2

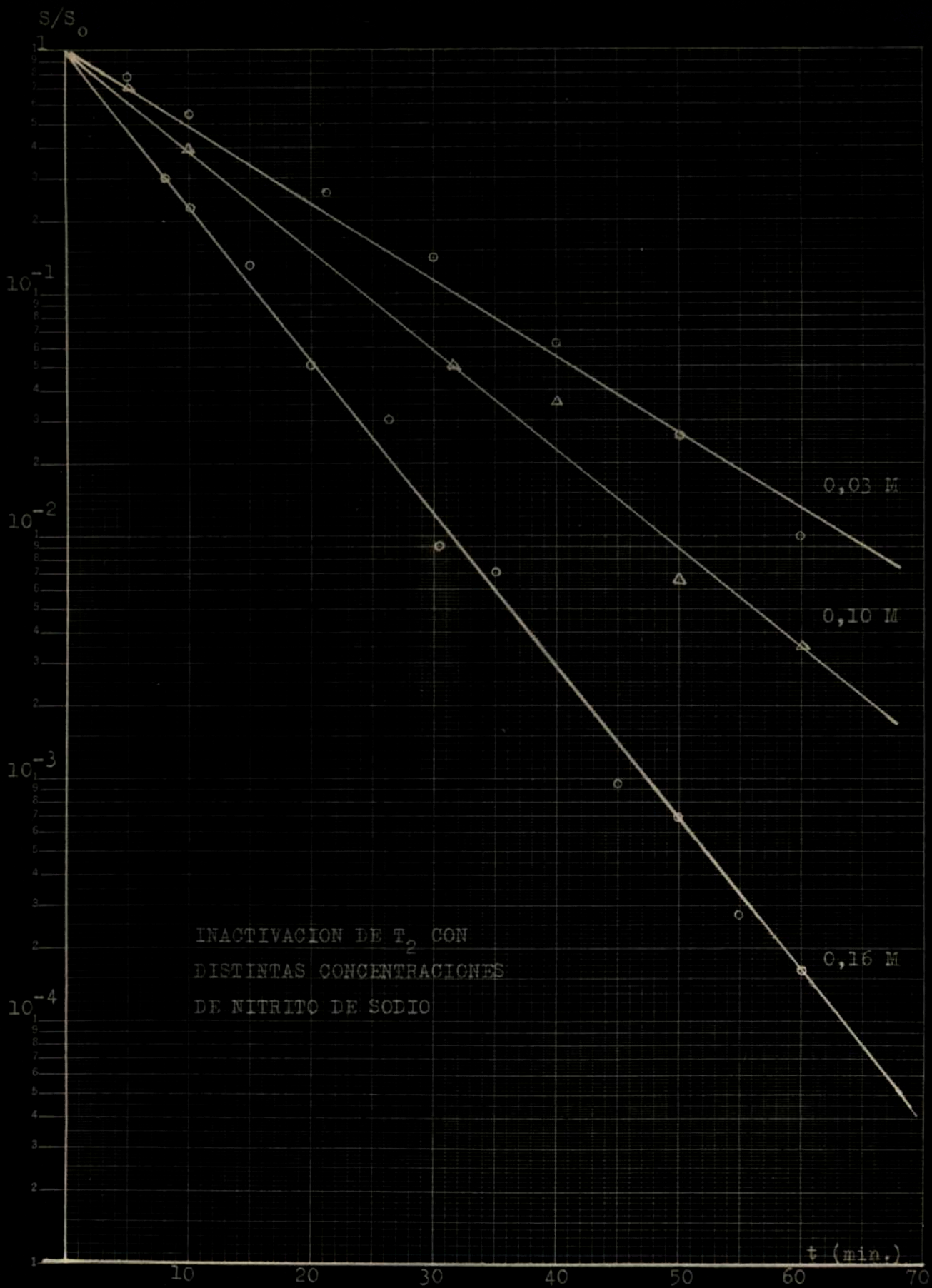


Fig.3

Inactivación de T₃

Las suspensiones de bacteriófagos T₃ se obtuvieron por lisis de cultivos de bacterias en caldo. Las suspensiones fueron concentradas por ultracentrifugación-

La inactivación de T₃ se realizó siguiendo técnicas similares a las descritas para T₂. Al plaquear se requieren diluciones algo mayores debido a que el número óptimo de placas para cada caja es inferior al correspondiente de T₂ debido a la mayor superficie cubierta por cada placa de T₃.

Durante la inactivación de T₃ se observó una mayor sensibilidad de este fago frente a la acción del pH.

En los cuadros de valores 6 al 9 se superpone la acción del ácido nítrico con un pequeño descenso del título durante la experiencia por efecto del pH 4, 5.

Sometiendo los fagos al pH. 5,1 no se comprobó descenso del título, mientras que el agregado de nitrito de sodio (en concentración tal que la suspensión de fagos resulte 1/8 molar) produce una inactivación cuya constante de tiempo k es de 11 minutos (tabla de valores n° 10).

Las placas de T₃ que se obtienen no presentan diferencias morfológicas. Por esta razón presumiblemente las mutantes son del tipo "host range" y pueden ser detectadas empleando como indicador la cepa E. coli B/S.

Inactivación de T₃

Tablas n° 6 y 7).

Experiencia n° 1.

k = 1,52 min.

tiempo (min.)	t/k	dilución total	número de placas	título f.u.c./ml	fracción sobreviviente
0	0	10 ⁵	500	2.10 ⁸	1
		10 ⁶	140		
		10 ⁷	24		
10	6,6	10 ⁴	16	1,3.10 ⁵	6,5.10 ⁻⁴
		10 ⁵	1		
20	13,3	10 ²	6	6.10 ²	3,0.10 ⁻⁶
		10 ²	7	6.10 ²	
30	19,7	10 ²	0		
		10 ³	0		

Experiencia n° 2.

k = 2,18 min.

0	0	10 ⁴	lísis conflua		4.10 ⁸	1	
		10 ⁵	"	"			
		10 ⁵	"	"			
		10 ⁶	387				
10	4,6	10 ⁴	260	2,4.10 ⁶	6,1.10 ⁻³		
		10 ³	22				
20	9,2	10 ²	lísis		8,9.10 ⁴	2,2.10 ⁻⁴	
		10 ³	85				
		10 ³	92				
30	13,9	10 ²	10	1.10 ³	2,5.10 ⁻⁶		
		10 ³	1				
		10 ³	0				
		10 ³	0				

Inactivación de T₃

(Tablas nos.8 y 9).

Experiencia nº 3.

k = 3,0 min.

TIEMPO (min.)	t/k	Dilución total	número de placas	título c.f.u./ml	fracción sobreviviente
0	0	10 ⁷	47	4,2.10 ⁸	1
		10 ⁷	36		
20	6,6	10 ⁵	6	7,0.10 ⁵	1,6.10 ⁻³
		10 ⁵	7		
30	9,8	10 ²	268	2,3.10 ⁴	5,5.10 ⁻⁵
		10 ³	20		

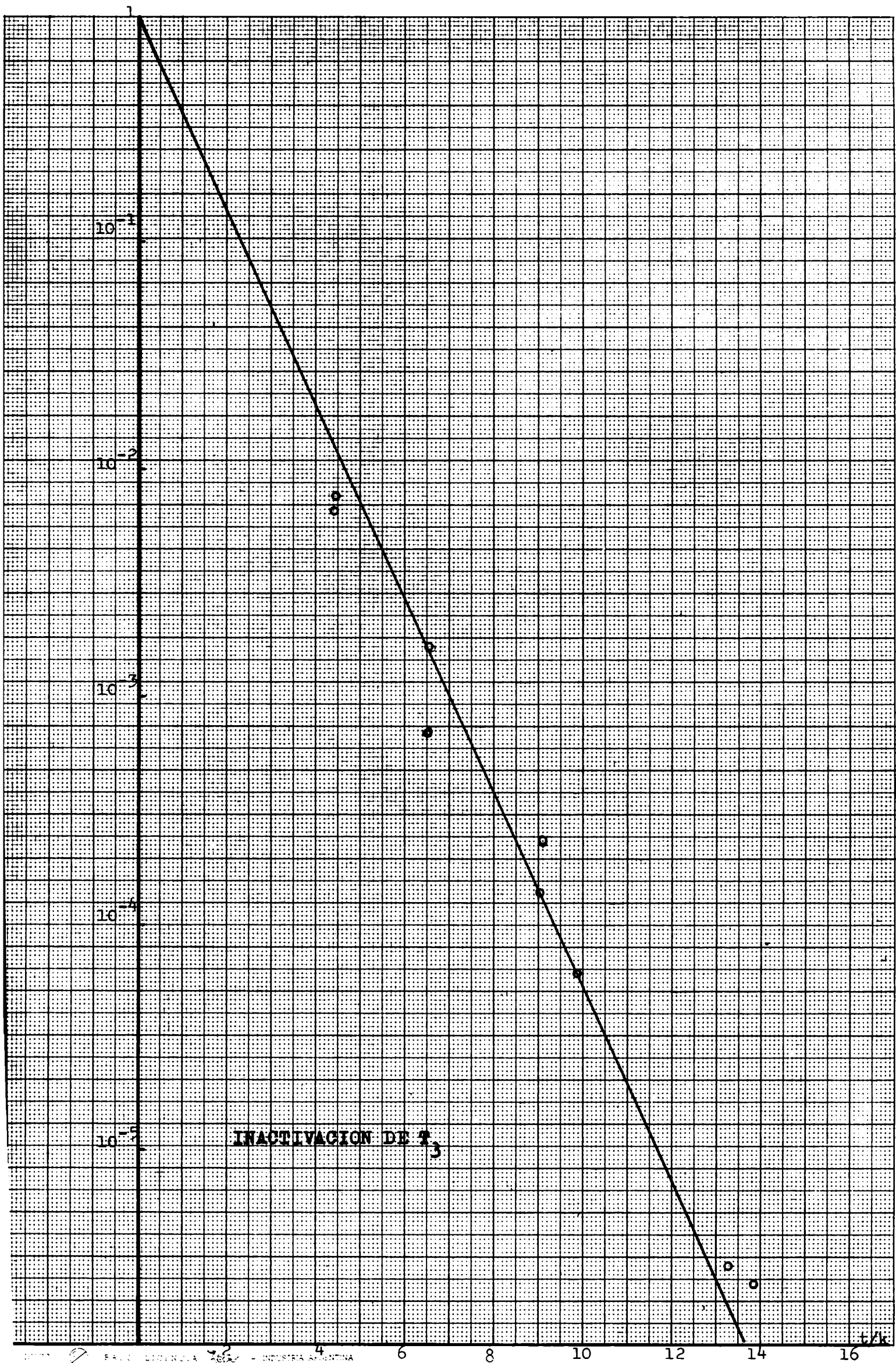
Experiencia nº 4.

k = 4,1 min.

0	0	10 ⁶	66	7,0.10 ⁷	1
			72		
19	4,6	10 ⁵	7	5,0.10 ⁵	7,2.10 ⁻³
			3		
38	9,2	10 ³	11	9,0.10 ³	1,3.10 ⁻⁴
			7		

En igualdad de condiciones los bacteriófagos T₃ son más sensibles a la inactivación y al PH ácido que los T₂.

Los valores de las cuatro experiencias se resumen en el gráfico siguiente que representa la inactivación de T₃ en función de t/k.



INACTIVACION DE T_3

Inactivación del T₃ (Tabla de valores n° 10)

k = 11 min.

Tiempo (min.)	Dilución total	N° de Placas	Título	Fracción Sobreviviente
0	10 ⁶	lisis		
	10 ⁷	147		
	10 ⁷	124	1, 3 . 10 ⁹	1
15	10 ⁶	248		
	10 ⁶	300		
	10 ⁷	30		
	10 ⁸	1		
	10 ⁸	8	3, 9 . 10 ⁸	2, 3 . 10 ⁻¹
60	10 ⁴	568		
	10 ⁵	64		
	10 ⁵	68		
	10 ⁶	0		
	10 ⁷	0		
	10 ⁷	0	5, 7 . 10 ⁶	4, 4 . 10 ⁻³

Mutagénesis

Simultáneamente con la inactivación los fagos T2 expuestos al ácido nítrico revelan un efecto mutagénico(23.2).

El mismo se pone de manifiesto con el método que se describe a continuación.

La preparación de fagos "in vitro" es incubada con NO_2 Na en la forma descrita para la inactivación.

Se extraen muestras a intervalos de 5 o 10 minutos durante un tiempo total de unos 40 o 50 minutos.

En los intervalos indicados en el cuadro de valores se extraen las muestras bloqueando en cada caso la reacción por dilución en buffer T2, PH 7, cuya composición se indica al final.

El rango de cada dilución depende en cada caso del título instantáneo conocido por la inactivación previamente descrita y establecida cuantitativamente.

La técnica varía en cuanto se emplea agar de base enriquecido con diversas sustancias nutritivas (la composición está indicada al final). La capa de agar nutritivo que se esparce en la superficie del agar de fondo tiene la misma composición que éste, a excepción del agar que se reduce al 6 %.

Las sustancias nutritivas del agar enriquecido permiten una mejor diferenciación morfológica de las placas originadas por mutantes fenotípicamente distintas.

Después de diluir convenientemente se plaquea.

Con el objeto de obtener un número elevado de placas y de asegurar los valores numéricos se plaquearon

diez cajas para cada intervalo de tiempo lo que permite observar varios miles de placas para cada muestra y un número apreciable de mutantes según se indica en las columnas correspondientes de la tabla de valores.

Después de incubar se cuentan las placas originadas por mutantes y las que son de "tipo salvaje".

Diversos fenotipos de mutantes

El aspecto de todas las mutantes no es uniforme dado que pertenecen fundamentalmente a cuatro tipos diferentes (Vielmether, Wieder), a saber:

t : (turbid halo) una placa de tamaño algo mayor que la placa de "tipo salvaje" de T2; con un centro nítido y una corona o halo turbio que abarca aproximadamente la mitad del radio de la placa; se los reconoce con dificultad cuando las placas se avicinan profusamente.

m : (minute), placa nítida de tamaño mucho menor que las de tipo salvaje (aproximadamente $1/5$ del diámetro);

"mottled" ; Un tipo de placa de aspecto irregular que presenta sectores de muy diverso crecimiento. Revelan heterogeneidad en su material genético.

r : (rapid lysing) placas que resaltan claramente en el conjunto de las demás, de diámetro unas dos y media veces mayor que el "tipo salvaje"; perfectamente nítidas y de borde igualmente nítido que contrasta claramente con el borde difuso y el menor tamaño del "tipo salvaje". Las mutantes del tipo r son las más frecuentes. Presentan además una característica peculiar que permiten distinguirles con claridad aún en cajas densamente cubiertas de placas y que consiste en una neta inhibición de su crecimiento cuando se hallan en proximidad de una placa "tipo salvaje".

Controlas

1º: Se realiza un control para el caso con el doble objeto de determinar el título y de asegurar la presencia de las mutantes espontáneas.

De la suspensión de fagos T2 destinada a la experiencia, contenida en buffer de PH 4, 5 (antes de agregar el nitrato) se plaquean 10 o 20 cajas (cada caja contiene varias centenas de fagos).

2º: Al cabo de una hora se repite el test precedente. El hecho de que prácticamente no se hayan detectado mutantes por este asegura que no hay efecto mutagénico causado por el buffer.

En estos controles se tuvo además la precaución siguiente: después de extraída la muestra se diluye en buffer de PH 7 que contiene nitrato en cantidad equivalente al que contienen las diluciones correspondientes durante la experiencia. No se observó efecto inactivante ni mutagénico en el fago T2. Esto prueba que la reacción queda realmente bloqueada por efecto de las diluciones.

Tratamiento de los resultados

En la tabla de valores figuran los resultados obtenidos. Por recuento del número de placas y teniendo en cuenta las diluciones empleadas para cada muestra se determinan los títulos de los fagos activos para los diversos instantes de la experiencia.

De las columnas correspondientes (en la tabla de valores) se obtiene el cociente; mutantes/placas observadas (N/p_o) que nos da la probabilidad P de detectar una mutante por cada placa observada. Representando gráficamente estos valores en función del tiempo (o bien de t/k) se obtiene una recta que está representada en la fig. y cumple la expresión:

$$P = \frac{N}{p_o} = \frac{N_o}{(p_o)_o} + 3,3 \cdot 10^{-3} t/k \quad 3.1$$

Con p_o : total de placas observadas,

Con $(p_o)_o$: " " " " " en la muestra correspondiente a $t = 0$

Con N_o mutantes espontáneas al instante $t=0$

$$\frac{N_o}{(p_o)_o} = 0,34 \cdot 10^{-3} \quad (\text{cuota inicial de mutantes}), \text{ Este valor tiene el significado de una cuota máxima,}$$

El factor $3,3 \cdot 10^{-3} = N / I \cdot p_o$ es la cuota de mutantes por cada impacto ($I = t / k$) y por placa observada p_o .

Si admitiésemos que las mutantes están igualmente distribuidas entre los activos y los inactivos obtendríamos el total de mutantes de la suspensión realizando el producto $\frac{N}{S_o}$ ($S_o =$ título inicial) con lo cual se obtendrían los mismos ^{PO} valores de la recta afectados de un factor constante.

Se evalúa la posibilidad de un proceso de selección

En una suspensión que originariamente contiene $2,93 \cdot 10^{10}$ fagos/ml admitimos hasta $N_0 = 10^7$ mutantes espontáneos. Este valor se determina sobre la base de datos obtenidos para $t=0$ y tiene el significado de una cota máxima. Comumente los valores se encuentran muy por debajo del indicado.

Al cabo de 50 minutos, cuando se ha llegado a una inactivación de $4,4 \cdot 10^{-4}$, las mutantes constituyen el 2,7% de los sobrevivientes.

Podría argüirse que el ácido nítrico tiene sólo un efecto de selección, es decir, que mientras los fagos del "tipo salvaje" se inactivan con una constante de tiempo k las mutantes espontáneas contenidas en la suspensión son inactivadas según una constante $k_m > k$; de aquí resultaría el aumento porcentual de las mutantes que se observa al final de la experiencia.

En este caso la disminución de las mutantes en función del tiempo estaría dada por la expresión.

$$N = N_0 e^{-t/k_m} \quad (\text{curva b}) \text{ Fig. 4}$$

Además según se vió anteriormente la inactivación de los fagos tipo salvaje cumple la ley:

$$S = S_0 e^{-t/k} \quad (\text{curva a}) \text{ Fig. 4}$$

Donde S = sobrevivientes al instante t , son los que dan p_0 placas en cada muestra)

La probabilidad P de hallar una mutante entre los sobrevivientes resulta:

..//

$$P' = \frac{N}{S} = \frac{N_0 \cdot e^{-\frac{t}{k_M}}}{S_0 \cdot e^{-\frac{t}{k}}} = \frac{N_0}{S_0} \cdot e^{t \left(\frac{1}{k} - \frac{1}{k_M} \right)}$$

con $k = 6,75$ minutos

$k_M = 14,8$ minutos

$N_0 = 10^7$ fagos/ml.

$S = 2,93 \cdot 10^{10}$ "

Los valores de N y S para cada instante se obtuvieron de las curvas g y h . (Fig. 4).

La exponencial g representa la inactivación de la suspensión total; la curva h la supuesta inactivación de las mutantes espontáneas. Calculando los cocientes $\frac{N}{S} = P'$ se obtienen los valores de la curva g' :

$$P'_0 = 3,4 \cdot 10^{-4}$$

$$P'_{1,48} = 8,3 \cdot 10^{-4}$$

$$P'_{2,98} = 2,1 \cdot 10^{-3}$$

$$P'_{4,45} = 4,7 \cdot 10^{-3}$$

$$P'_{5,9} = 1,1 \cdot 10^{-2}$$

$$P'_{6,7} = 1,7 \cdot 10^{-2}$$

$$P'_{7,4} = 2,7 \cdot 10^{-2}$$

Su forma se aparta considerablemente de la obtenida experimentalmente, razón por la cual no se puede suponer un proceso de selección, dado que los resultados que en este caso se obtendrían son incompatibles con los resultados de la experiencia.

Por razones análogas es inconsistente el argumento de que podría tratarse de mutantes resistentes (no susceptibles al efecto del ácido nitroso) cuya proporción iría en aumento en las sucesivas muestras conforme disminuye el título de los fagos "tipo salvaje".

..//

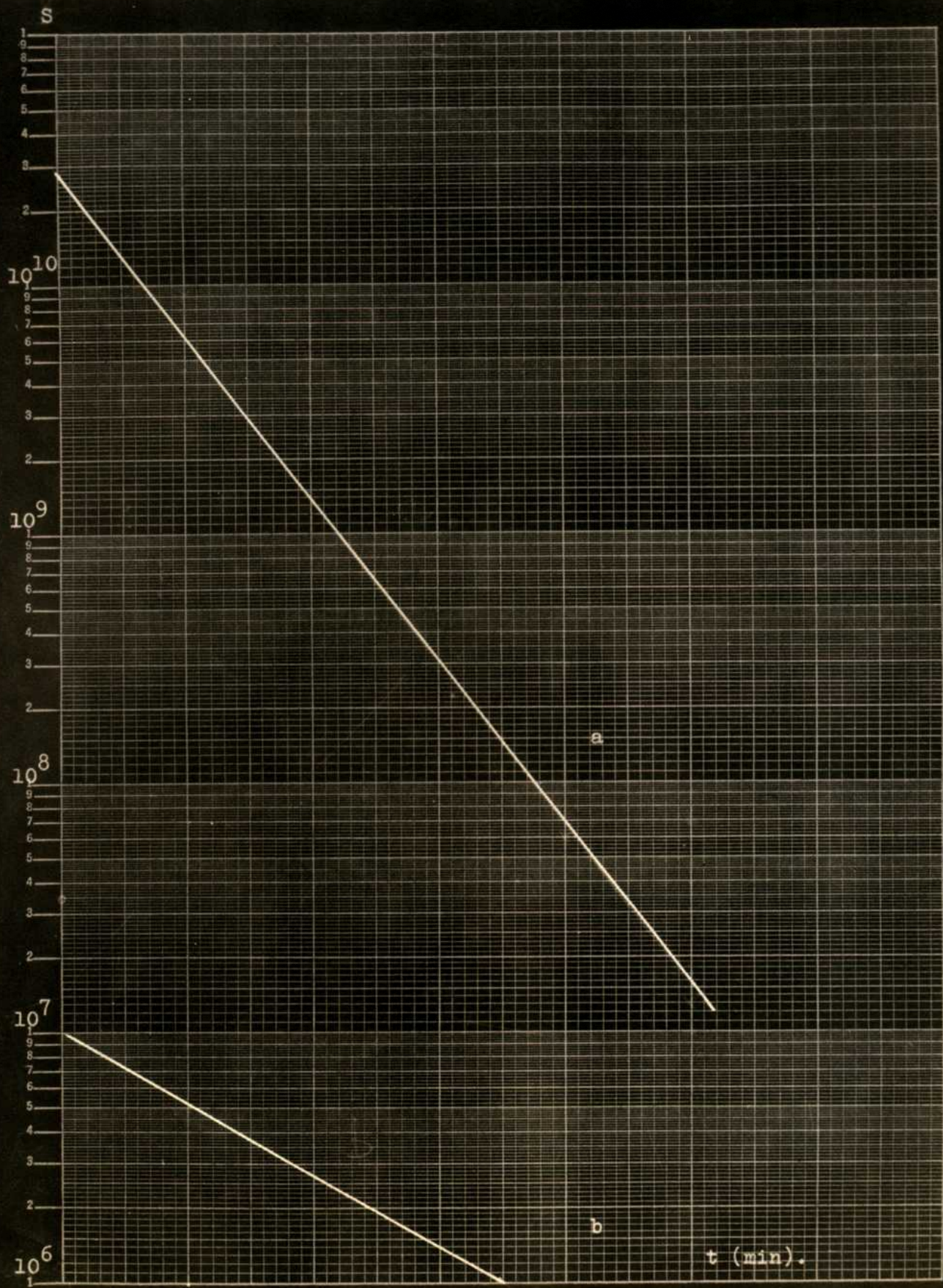
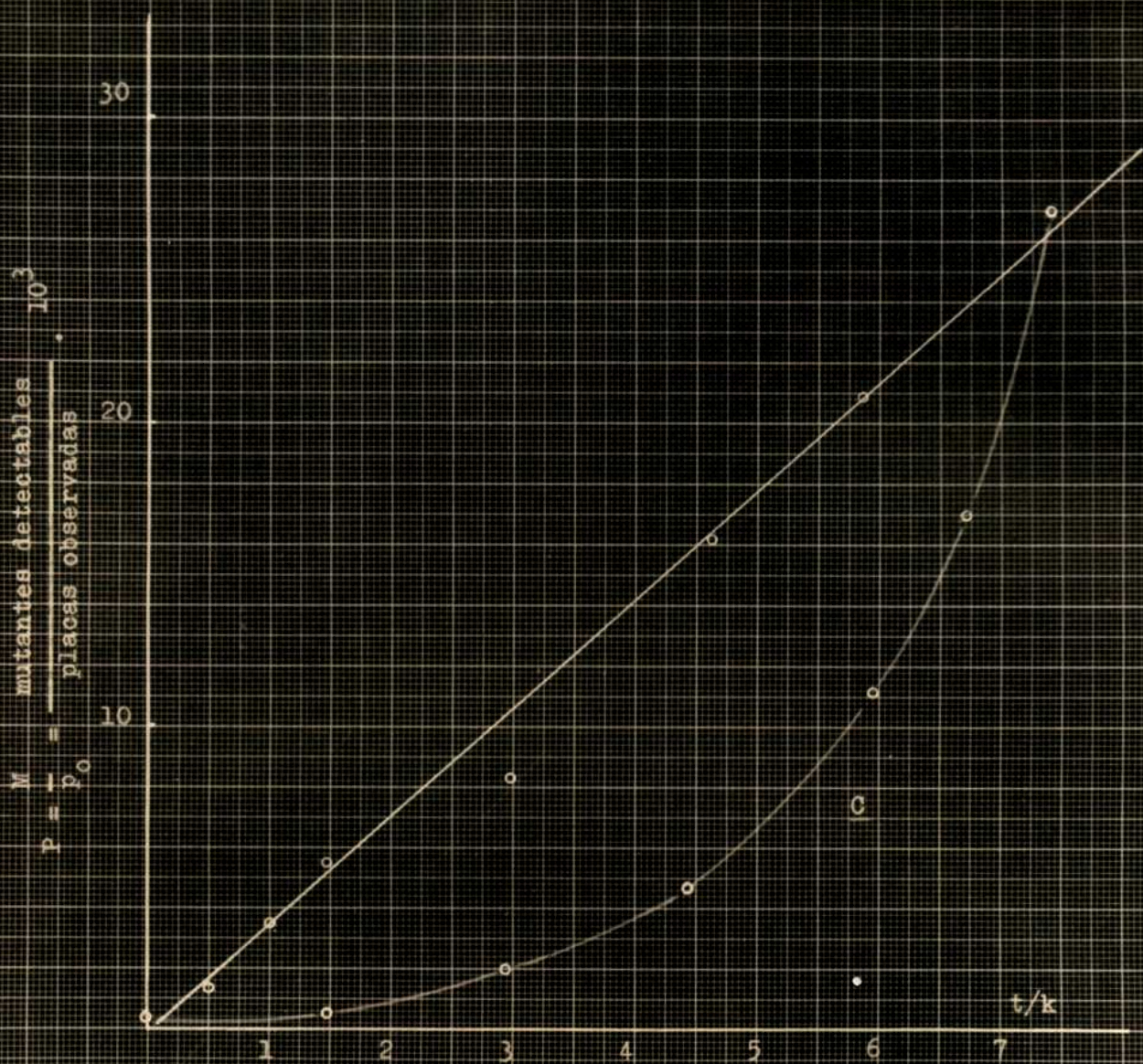


Fig 4



— PROBABILIDAD DE DETECTAR UNA MUTANTE POR CADA PLACA OBSERVADA.

— CURVA C : SE OBTENDRIA EN CASO DE HABER SELECCION .

Fig 5

De la fórmula de Poisson del cálculo de probabilidades se obtiene para los sucesivos lapsos $I = 1, 2, 3, \dots$ la proporción de fagos $P(n)$ que recibieron $n = 0, 1, 2, 3, \dots$ eventos en su genómico.

$$P(n) = \frac{I^n \cdot e^{-I}}{n!}$$

Fijando $I = 1$ se obtiene:	fijando $I = 2$ resulta
$P(0) = 0,37$	$P(0) = 0,135$
$P(1) = 0,37$	$P(1) = 0,275$
$P(2) = 0,19$	$P(2) = 0,270$
$P(3) = 0,06$	$P(3) = 0,179$

Por otra parte derivando P respecto de I se obtiene:

$$\frac{dP}{dI} = \frac{n I^{n-1} \cdot e^{-I} - I^n \cdot e^{-I}}{n!}$$

Si hacemos $n = 1, 2, 3, \dots$ e igualando a cero el 2º miembro resultan los máximos correspondientes a $I = 1, 2, 3, \dots$ respectivamente, es decir, habremos determinado en cada caso los valores de I para los cuales es máxima la proporción de fagos alcanzados $1, 2, 3, \dots$ veces.

Así por ejemplo, los fagos alcanzados por un sólo evento, llegan a representar el 37 % (es decir, la máxima proporción en que se los puede lograr) al cabo de un lapso $I = 1$. Del mismo modo los fagos alcanzados por dos impactos (se excluyen los que recibieron uno sólo o más de dos) llegan a un máximo del 27,5 % cuando $I = 2$.

El efecto antagónico (del ácido nitroso sobre el bacteriófago T2) en función del tiempo.

En una suspensión dada de bacteriófagos llamamos efecto antagónico E al número instantáneo de mutantes detectables en función del tiempo.

Decimos en una suspensión dada, porque el efecto dependerá del tipo de fago y de las condiciones de la experiencia (temperatura, PH, concentración del NO_2Na , etc.).

Llamamos número instantáneo de mutantes al total de las mutantes contenidas en la suspensión en el instante en que es extraída la muestra.

Nos referimos a las mutantes detectables exclusivamente, es decir, refieren dos condiciones: 1°) pertenecen a la fracción de sobrevivientes (si estuvieran inactivadas no se podría afirmar si además del impacto inactivante recibieron otro mutagénico); 2°) dan un tipo de placa que es característica y distinta del tipo salvaje, manteniéndose hereditariamente estable a través de sucesivos pasajes (reproducciones).

La cantidad total de mutantes detectables está dada por el producto $\frac{M}{p_0} S$.

Donde $M/p_0 = P$ probabilidad de hallar una mutante por cada placa observada.

$M/p_0 =$ (mutantes sobre placas observadas).

S título instantáneo, es decir, sobrevivientes al instante t.

De las expresiones 2.1 y 3.1 resulta:

$$E = \frac{M}{p_0} \cdot S = (M_0 / p_0 + 3,3 \cdot 10^{-3} I) S_0 \cdot e^{-I} \quad (4.1)$$

..//

Derivando esta función respecto de I resulta:

$$\frac{dE}{dI} = K \cdot e^{-I} (1 - I)$$

donde $3,3 \cdot 10^{-3} S_0 = K$

igualando a cero obtenemos un máximo o un mínimo para $I=1$.

La derivada segunda es $\frac{d^2E}{dI^2} = K e^{-I} (I - 2)$ (4.2)

que para $I = 1$ es negativa de donde resulta que la función 4.1 presenta un máximo en ese punto. Siendo el valor de la ordenada en dicho máximo de $3,7 \cdot 10^7$. Además la (4,2) se anula para $I = 2$ de donde resulta para este valor un punto de inflexión en la curva..

Estos resultados concuerdan con los obtenidos experimentalmente.

Con los datos de la tabla de valores se ha representado el producto $M/p_0 \cdot S$ en función de I. La curva así obtenida muestra un aumento inicial en el total de mutantes con su máximo para $I = 1$ (fig. 6); predomina luego la inactivación.

Por otra parte este aumento neto descarta la posibilidad de un proceso de selección. Permite asimismo afirmar que el efecto mutagénico es consecuencia de un sólo impacto en el material genético del fago.

Efecto mutagénico del ácido nitroso sobre bacteriófagos T2.

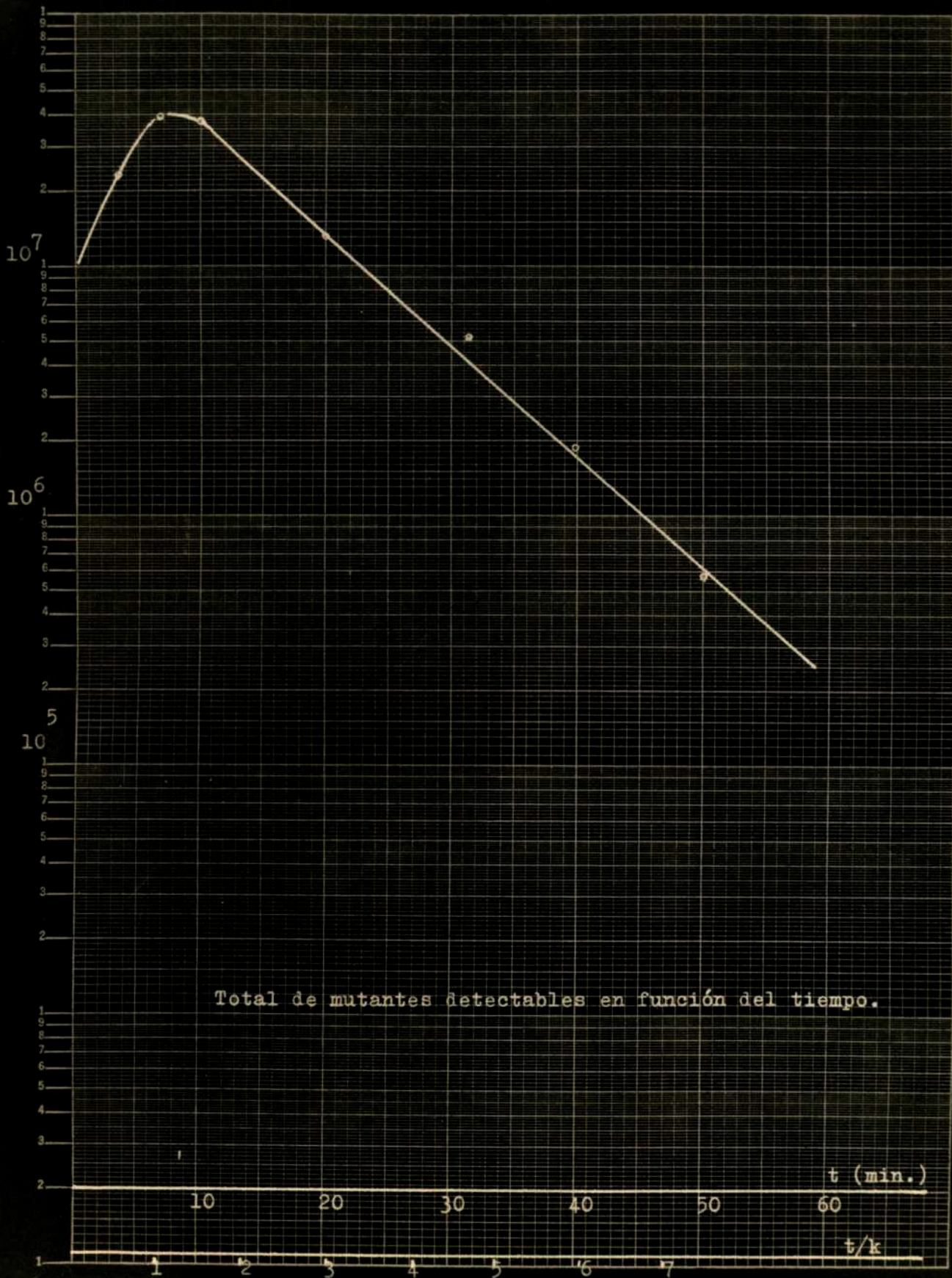
t (min)	t/k	Placas observadas P _o	Título S (fagos/ml)	S/S _o	Mutantes observadas M	$P = \frac{M}{P_o}$	Efecto mutagénico E = P.S	Total de impactos mutagénicos P.S _o
0	0	2,9.10 ³	2,9.10 ¹⁰	1	1	3,4.10 ⁻⁴	1,0.10 ⁷	1,10 ⁷
3,37	0,5	3,0.10 ³	1,8.10 ¹⁰	6,2.10 ⁻¹	(4)	1,3.10 ⁻³	2,4.10 ⁷	3,9.10 ⁷
6,75	1	4,0.10 ³	1,1.10 ¹⁰	3,8.10 ⁻¹	(14)	3,5.10 ⁻³	3,9.10 ⁷	1,0.10 ⁸
10	1,48	4,5.10 ³	7,0.10 ⁹	2,4.10 ⁻¹	25	5,5.10 ⁻³	3,8.10 ⁷	1,6.10 ⁸
20	2,98	2,2.10 ³	1,5.10 ⁹	5,2.10 ⁻²	19	8,6.10 ⁻³	1,3.10 ⁷	2,5.10 ⁸
31,3	4,65	1,3.10 ³	3,2.10 ⁸	1,1.10 ⁻²	21	1,6.10 ⁻²	5,1.10 ⁶	4,7.10 ⁸
40	5,9	1,0.10 ³	8,8.10 ⁷	3,0.10 ⁻³	21	2,1.10 ⁻²	1,85.10 ⁶	6,2.10 ⁸
50	7,4	9,1.10 ²	2,1.10 ⁷	7,0.10 ⁻⁴	24	2,7.10 ⁻²	5,7.10 ⁵	7,9.10 ⁸

() : Valores calculados según las curvas a y b

(P_o)_o = 2,9.10³

S_o = 2,9.10¹⁰

(Tabla de valores n° 11)



Total de mutantes detectables en función del tiempo.

Fig. 6

Efecto del ácido nítrico en la estructura del fago

La desaminación producida por el ácido nítrico en el bacteriófago tiene lugar tanto en el ADN como también en su estructura proteica. Cabe entonces considerar en que medida los efectos observados podrían ser una consecuencia de alteraciones producidas en la proteína, por ejemplo, en el extremo de la cola destinada a la adsorción.

Para dilucidar esta alternativa se realizaron experiencias con el bacteriófago PLT 22 de *Salmonel Typhimurium* (23.2) sometiéndolos al ácido nítrico. Las muestras extraídas a diversos intervalos fueron plaqueadas en cada caso con el objeto de determinar cuantitativamente la inactivación, como asimismo su capacidad de transducción.

Se comprobó que aún cuando la inactivación ha descendido a un valor de 10^{-5} los fagos conservan aún una cuarta o una quinta parte de su capacidad de transducción. (Vielmetter, comunicación personal).

La transducción de determinados marcadores de una bacteria perteneciente a una determinada cepa a otra de una cepa distinta no sería posible de no mediar la adsorción en la pared bacteriana, lo que prueba que las alteraciones químicas que pudieran ocurrir en la parte proteica no son las determinantes del proceso de inactivación, o en el mejor de los casos sólo intervienen en magnitud despreciable.

Podemos aceptar por lo tanto que los efectos de inactivación y mutación observados son imputables a las alteraciones que tienen lugar en la macromolécula de ADN.

Estabilidad hereditaria de las mutantes obtenidas.

Las placas de mutantes obtenidas fueron resuspendidas aisladamente y plaqueadas nuevamente a fin de obtener la descendencia de las mismas.

Para las de tipo \underline{g} se verificó la estabilidad fenotípica y morfológica de la placa.

El tipo "mottled" en cambio tiene una descendencia heterogénea que se descompone en tres distintos tipos de placas, a saber: 1°) un 35 % a 55 % de tipos \underline{r} , 2°) 45% a 65% de "tipo salvaje" y 3°) 0,05% a 1% mottled. Realizando nuevos pasajes de multiplicación de cada uno de estos tipos se comprobó que los dos primeros son estables mientras el tercero vuelve a dar las tres mutantes diversas en las mismas proporciones.

Esta persistencia en el comportamiento de todas las placas tipo mottled indica que no se trata de un material hereditariamente inestable sino que su estructura es análoga a la de los fagos heterocigotas, dado que se comporta como los provenientes de cruzamientos de dos fagos diversos (Hershey y Chase, 1951). Resultan por tanto diploides por lo menos en la parte de su genomio donde tuvo lugar la mutación. Por otra parte para valores de I comprendidos entre siete y diez los mottled representan de 30 a 40 % de los \underline{r} , de lo cual se infiere que la parte diploide del genomio abarca una amplia fracción de éste o tal vez su totalidad.

Experiencias de reconstrucción.

Las mutantes originarias obtenidas por efecto del \underline{g} ácido nítrico se multiplicaron separadamente por infección de cultivos de bacterias y luego de purificar la suspensión por los procedimientos descritos se las sometió a una nueva inae-

tivación. La constante de tiempo observada es prácticamente la misma que para el tipo salvaje, dado que mezclas de partes iguales de mutantes y de tipo salvaje conservan muy aproximadamente la misma proporción de sus componentes a lo largo de una inactivación de hasta 10^{-3} .

El factor de enriquecimiento en la razón fagos tipo χ /fagos tipo salvaje no pasa de unas pocas unidades. En el caso de haber selección, el enriquecimiento de fagos χ (de la suspensión inactivada) debería ser unas 100 veces mayor.

Confrontación de resultados

Los resultados obtenidos por Tessman (38) al estudiar el efecto del NO₂K sobre los fagos ϕ X174 y T4 coinciden con los aquí expuestos en cuanto a la cinética de la reacción y al crecimiento lineal de la proporción de mutantes en función de I.

Las mutantes de ϕ X174 dan colonias puras, es decir, dan placas cuyos individuos constitutivos pertenecen al mismo tipo de mutante, mientras las placas de mutantes de T4 contienen frecuentemente individuos diversos, a saber, mutados y de tipo salvaje.

Estos resultados indicarían la presencia de una sola copia del material genético en el ϕ X174 y de una doble copia para T4.

Efecto genético de la desaminación

Tessman considera que cuando una base es sustituida por otra anormal, es decir, de las que originalmente no forman parte del ADN, puede seguirse: 1°) una incapacidad para la multiplicación del material genético debido a que la alteración del cifrado condujo a un "non sense" (sin razón) o bien; 2°) puede ser sustituida por otra normal; si ésta es la misma que originalmente ocupaba ese lugar se ha reobtenido el tipo salvaje, es decir, la clave cifrada fué reconstruida; si en cambio es sustituida por otra distinta pero viable a los efectos de la multiplicación habremos obtenido una mutante.

En el caso 1° y comparando con los resultados de Vielmetter y Schuster se puede afirmar que considerando que la desaminación afecte una guanina dando xantina, la separación de ésta por el carácter lábil de su unión traería como consecuencia la interrupción de la secuencia natural de las bases.

..//

Si en cambio la denominación afecta a HGU o bien la adenina, se puede inferir que de acuerdo con el esquema de Violmetter Schuster un par (AF) se presenta por (GU) y viceversa; en ambos casos, y según cual fuese la ubicación del par en la cadena puede darse ya sea "non sense" o bien una alteración viable y hereditariamente estable, es decir, una mutante.

INTERPRETACION GENETICA DE LOS RESULTADOS

a frecuencia con que se producen los efectos inactivantes es mucho mayor que la de los mutagénicos. Además la curva de inactivación indica que el proceso es consecuencia de un sólo impacto. Genéticamente la inactivación puede interpretarse de diversas maneras: Cuando el genoma es alcanzado por un impacto, éste afecta a una de las dos cadenas del ADN, pero actúa sobre la totalidad del genoma considerado como unidad, ya sea, porque impide la separación, o la duplicación de ambas cadenas, o bien, porque determina una función no viable. Esto puede ser consecuencia de la desaminación de una guanina dado que la xantina resultante presenta la tendencia a desprenderse del resto de la molécula debido a su mayor labilidad en la unión glucosídica. Experimentalmente se ha probado este efecto, al menos para pH ácido (Schuster y Vielmetter)

Pero no todos los impactos son inactivantes; algunos afectan sólo una cadena resultando placas del tipo "mottled". Estas se pueden interpretar como resultado de la duplicación de una cadena intacta (tipo salvaje) y otra que sufrió una mutación tipo F.

Esta interpretación se vería confirmada por el hecho de que la descendencia de los fagos que componen una placa "mottled" no es homogénea sino que se compone, al menos en el 99,9% de los casos, de tipos F y salvajes.

Las placas tipos F provenirían de un genoma en que un impacto alteró ambas cadenas simultáneamente, o bien un doble impacto que afecta un mismo locus, o bien un doble impacto tal que una cadena queda inactivada y la otra mutada.

RESUMEN

El ácido nítrico es, al decir de Temman (1979), un elegante agente mutagénico. La virtud del mismo reside en que el virus puede ser tratado "in vitro", libre de la compleja influencia de la célula huésped y además en que altera directamente las bases que son consideradas elementos constitutivos de la clave cifrada contenida en el ADN.

Los resultados mutagénicos pueden ser interpretados en función de propiedades moleculares del material genético.

Estas cualidades y ventajas permiten conseguir los siguientes resultados.

RESULTADOS OBTENIDOS

Se logró:

- 1º: verificar por primera vez que ^{este} agente mutagénico actúa sobre el fago en estado de inactividad metabólica;
- 2º: someter al fago a una reacción cuyos productos son estables y definidos (esto no suele ocurrir cuando se lo somete a radiaciones);
- 3º: probar que no se trata de un fenómeno de selección sino de un aumento real de las mutaciones por efecto del ácido nítrico;
- 4º: descartar el hecho anteriormente admitido de que el fago sólo puede mutar cuando el agente actúa durante el ciclo vegetativo de reproducción en la bacteria. (Adams: Bacteriophages, pag. 119 y 116; 1979);
- 5º: Estudiar cuantitativamente el proceso de inactivación de T2 y T1, como así también el aumento absoluto de mutaciones que forman parte de la fracción de fagos activos.
- 6º: Probar que se trata de un agente mutagénico muy eficaz. Posiblemente el que produce la mayor proporción de mutaciones entre todos los agentes conocidos.
- 7º: Obtener una extensa variedad de mutaciones aptas para ser empleadas en experiencias de recombinación, reactivación múltiple, cross-reativación u otras que permitan un mejor conocimiento del mecanismo de replicación del ADN y de la importancia biológica de las subunidades que lo integran.

Abreviaturas empleadas

A	:Adenina
AN	:ácido nucleico
ADN	:ácido desoxirribonucleico
ARN	:ácido ribonucleico
C	:citosina
DNasa	:desoxirribonucleasa
G	:guanina
HMC	:hidroximetilcitosina
RNasa	:ribonucleasa
T ₁ , T ₂ , ... T ₇	:bacteriófagos que atacan a bacterias Escherichia Coli
U	:uracilo
VMT	:virus del tabaco

COMPOSICION DE LOS MEDIOS EMPLEADOS

CALDO NUTRITIVO

1 litro agua dest.
5 gr Cl Na
8 gr caldo en polvo

Agar nutritivo para base de cuisa

1 litro agua dest.
5 gr Cl Na
8 gr caldo en polvo
15 gr agar en polvo, o bien 17 gr
agar en rama

Agar nutritivo carnosado (Hovsbo)
para base de cuisa

10 gr Bacto-agar
13 gr Bacto-tryptone
8 gr Cl Na
2 gr Citrato de sodio
3 gr glucosa
1 litro agua dest.

Agar blando

1 litro agua dest.
5 gr Cl Na
8 gr caldo en polvo
7 gr agar en polvo

Bufer para fase F₂

1 litro agua dest.
5 gr SO₄K₂
4 gr Cl Na
1,5 gr PO₄K₂
7,4 gr PO₄H Na₂ · 12 H₂O, o bien, 3,6 gr PO₄H Na₂ · 2H₂O
1 ml gelatina al 1%
10 ml 0,01 N Cl Ca (solución)
10 ml 0,1 N SO₄Mg (solución)

BIBLIOGRAFIA

- 1.1.-Adams, M.H. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc. N.York (1959).
- 1.2.-Anderer, F.A. et al. Primary structure of the protein of TMV. Nature 186, 922 (1960).
- 1.3.-Anderson, T.F. "Bacterial viruses. Structure and Function" en The bacteriophages. Gunsalus, I.C. Stanier, R.Y. (Editores). Ac. Press N.York p.387 (1960).
- 1.4.-Anfinsen, O. The molecular basis of evolution. John Wiley and Sons. N.York (1959).
- 2.1.-Benzer, S. Fine structure of genetic region in bacteriophages T₄. Proc. Nat. Ac. Sc. 41, 344 (1955).
- 2.2.-Blau, M. y Altenburger, K. Über einige Wirkungen von Strahlen II. Z. Physik 12, 315 (1923).
- 2.3.-Brenner, S. et al. Structural components of bacteriophages. J. Mol. Biol. 1, 281 (1959).
- 4.1.-Delbrück, M. Introductory remarks about the program. Cold S.H. Symp. Quant. Biol. 18, 1 (1953).
- 4.2.-Deermann, A.H. The vegetative state in the life cycle of bacteriophage. Cold S.H. Symp. Quant. Biol. 18, 3 (1953).
- 4.3.-Dessauer, F. Über einige Wirkungen von Strahlen I. Z. Physik 12, 38 (1923).
- 6.1.-Fernandez Morán, H. y Schramm, G. The structure of Tobacco Mosaic Virus as revealed in Ultrathin sections of electron microscopy. Z. Naturforsch. 13b, 68 (1958).
- 6.2.-Fraenkel-Conrat, H. y Williams, R.C. Reconstitution of active Tobacco Mosaic Virus from the inactive protein and nucleic acid components. Proc. Nat. Acad. Sc. 41, 490 (1956).
- 6.3.-Franklin, R.E. et al. X-Ray diffraction studies of the structure and morphology of TMV. Ciba Found. Symp. On the nature of viruses. London p.39n (1957).
- 6.4.-Franklin, R.E. y Gosling, R.C. Molecular structure of nucleic acids. Nature 171, 740 (1953).
- 6.5.-Freese, G. Mutagenic effect of base analogues on T₄. J. Mol. Biol. 1, 87 (1959).

- 7.1.-Gierer, A. y Schramm, G. Infectivity of RNA from TMV. *Nature* 177, 702 (1953).
- 7.2.-Gierer, A. y Schramm, G. Die Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch.* 11b, 138 (1956).
- 7.3.-Gierer, A. Structure and biological function of RNA from Tobacco Mosaic Virus. *Nature* 179, 123 (1957).
- 7.4.-Gierer, A. Größe und Struktur der Ribonucleinsäure des TMV. *Z. Naturforsch.* 13b, 477 (1958)a.
- 7.5.-Gratia, A. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophage (Technique et titrage du bactériophage). *Ann. Inst. Pasteur* 57, 652 (1936).
- 7.6.-Causalis, I. G. Stanier, R. Y. (Editors). *The bacteriophage*. Ac. Press. N. York (1954).
- 8.1.-Haas, J. *Physiologie der Zelle*. Gehr. Borntraeger, Berlin (1955).
- 8.2.-Hershey, A. D. y Chase, M. Genetic recombination and heterozygosity in bacteriophage. *Cold S. H. Symp. Quant. Biol.* 16, 471 (1951).
- 8.3.-Hershey, A. D. Bacteriophages as genetic and biochemical systems. *Advances in virus research* 4, 25 (1957).
- 8.4.-Hershey, A. D. y Chase, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36, 39 (1952).
- 11.1.-Kozloff, H. M. Origin and fate of bacteriophage material. *Cold S. H. Symp. Quant. Biol.* 18, 207 (1953).
- 12.1.-Lew, D. E. *Action of radiations on living cells*. Cambridge Un. Pr. 1a. edic. (1946); 2a. edic. (1955).
- 12.2.-Levinthal, C. Genetic and the role of nucleic acids. *Rev. Mod. Physiol.* 31, 227 (1959).
- 14.1.-Mundry, I. W. y Gierer, A. Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nucleinsäure in vitro. *Z. Vererbungslehre* 89, 614 (1958).
- 17.2.-Oncley, J. I. (Editor) *Biophysical Science*. J. Wiley and sons N. York (1954).
- 18.1.-Putnam, F. M. Ultracentrifugation of bacterial viruses. *J. Polymer Science* 12, 391 (1954).
- 20.1.-Setlow, J. y Setlow, R. B. Single-stranded Stage of T_2 during replication. *Proc. Nat. Ac. Sc.* 46, 791 (1960).
- 20.2.-Schäfer, W. et al. Inaktivierung verschiedener pflanzlicher und tierischer Virusarten sowie des TMV durch salpetrige Säure. *Z. Naturforsch.* 14b, 632 (1959).

- 20.3.-Schuster, H. y Schramm, G. Bestimmung der biologischen wirksamen Einheit der DNS des TMV auf chemischen Wege. Z.Naturforsch 13b, 697 (1958)
- 20.4.-Schuster, H. Die Reaktionsweise der DNS mit salpetriger Säure. Z. Naturforsch. 13b, 298 (1960).
- 20.5.-Schramm, G. et al. Über die Struktur des TMV. Z.Naturforsch 10b, 43 (1955)
- 20.6.-Schramm, G. Die Rolle der Nucleinsäure bei der Vermehrung der Viren. Jahrbuch 1958 der Max Planck Gesellschaft.
- 20.7.-Stahl, F.W. Radiobiology of bacteriophage in "The Viruses". Burnet, F.M. y Stanley, W.M. (Editores) Ac. Press. Vol. 2, 353 (1959).
- 20.8.-Stent, G.S. Mating in the reproduction of bacterial viruses. Advances in Virus Research 5, 95 (1958).
- 20.9.-Stent, G.S. Intracellular multiplication of bacterial viruses in "The Viruses". Burnet, F.M. Stanley, W.M. (Editores). Ac. Press. Vol. 2, 237 (1959)
- 20.10. Swanstrom, M. y Adams, M.H. Agar layer method for production of high titer phage stocks. Proc. Sec. Exp. Biol. Med. 78, 372 (1951).
- 21.1.-Taylor, H.W. et al. The particle weight, hydration and shape of the T₂ bacteriophage of Esch. coli. J. Am. Chem. Soc. 77, 1270 (1955).
- 21.2.-Tessman, I. Mutagenesis in phage ϕ X174 and T₄ and properties of the genetic material. Virology 9, 375 (1959).
- 23.1.-Vielmetter, W. y Schuster, H. Die Basenspezifität bei der Induktion von Mutationen durch salpetrige Säure im Phagen T₂. Z.Naturforsch 15b, 304 (1960).
- 23.2.-Vielmetter, W. y Wieder, C.H. Mutagene und inaktivierende Wirkung salpetriger Säure auf freie Partikel des Phagen T₂. Z.Naturforsch 13b, 312 (1959).
- 24.1.-Watson, J.D. y Crick, F.H. Molecular structure of nucleic acids. A structure of Desoxyribose Nucleic Acid. Nature 171, 737 (1953).
- 24.2.-Watson, J.D. y Maaloe, O. Nucleic acid transfer from parental to progeny bacteriophage. Biochim. Biophys. Acta 10, 432 (1953).
- 24.3.-Weidel, W. Phage receptor systems of Esch. coli B. Cold. S. H. Symp. Quant Biol. 18, 155 (1953).

C. H. Wieder