

Investigación Clínica. N° 18. Págs. 7-26. Junio 1966.

EFFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES
SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN GENÉTICA DE LAS BACTERIAS

— **Dr. Heber Villalobos C.**

Profesor de la Cátedra de Bioquímica.
Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia.

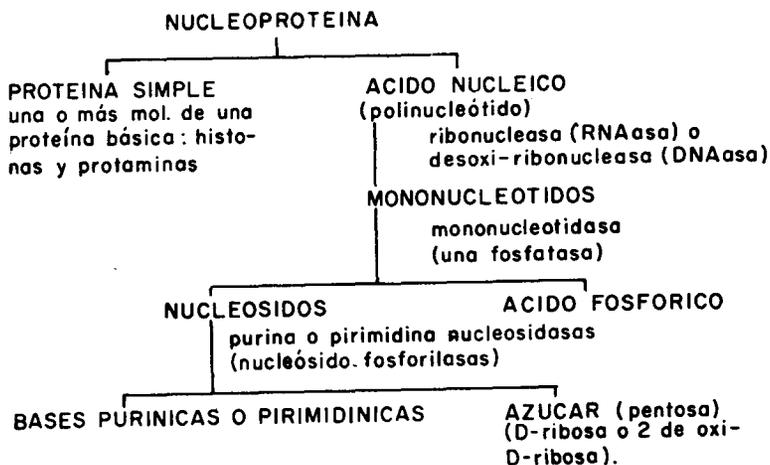
Revisión

Con el nombre de **transcripción genética**, se designa el fenómeno biológico mediante el cual tiene lugar la síntesis de las macro-moléculas (de las cuales las más importantes son las proteínas), en la célula viva; fenómeno prodigioso que se realiza con la intervención de los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos aun cuando se encuentran en todas las células vivientes formando parte de moléculas sumamente complejas como lo son las núcleo-proteínas, no tienen estructura proteínica en sí.

Se conocen dos tipos principales de ácidos nucleicos: el D N A (ácido desoxi-ribonucleico) y el R N A (ácido ribonucleico), diferenciándose por contener el primero en su estructura la 2-desoxi-D-ribosa y el segundo la D-ribosa. Además presentan otras diferencias estructurales.

De una manera general los ácidos nucleicos están constituidos por un carbohidrato (una pentosa), ácido fosfórico y bases purínicas y pirimidínicas.



El D N A se encuentra casi exclusivamente en el núcleo (formando parte de los cromosomas), mientras que el R N A se encuentra principalmente en el citoplasma.

De lo dicho anteriormente se deduce que el D N A juega un papel de primer orden en la transmisión de los caracteres hereditarios; mientras que el R N A está relacionado con la síntesis de las proteínas. Esto es cierto con algunas excepciones, pues el R N A constituye el material hereditario en los bacteriófagos (virus que invaden y parasitan las bacterias y que se conocen con el nombre abreviado de fagos) y en otros tipos de virus.

Los genes son estructuras o unidades funcionales que llevan los caracteres hereditarios de célula a célula y de generación a generación. Ellos cumplen sus funciones mediante el proceso de duplicación, el cual tiene lugar en la célula con ayuda de enzimas. Actualmente se conoce bien la composición química de estas estructuras. Los genes están constituidos por D N A en la inmensa mayoría de los seres vivos uni y multi-celulares. Los genes actúan como moldes para la formación del producto de los genes (R N A mensajero) y para la formación de otros genes; el producto de los genes es un intermediario entre el gene (DNA) y la síntesis de las proteínas en la célula. La mayoría de las proteínas conocidas poseen propiedades enzimáticas y llevan a cabo sus funciones dirigidas por los genes. El contenido en DNA de cada célula es prácticamente constante durante el período de interfase celular; dicho contenido se duplica mientras transcurre el fenómeno de la reproducción celular.

Existen varios tipos de RNA a saber: el RNA mensajero (cuya síntesis tiene lugar en el núcleo como ya hemos señalado), siendo el encargado de transmitir la información del código genético bajo el cual serán sintetizadas las proteínas, desde el núcleo hasta el citoplasma; el RNA soluble o de transferencia, encargado de llevar los aminoácidos previamente activados hasta el ribosoma (existe un RNA soluble específico para cada aminoácido); y el RNA de los ribosomas que, como su nombre indica, forma parte de los ribosomas y sirve de molde donde tiene lugar la síntesis de las proteínas. El contenido en RNA es elevado en las células que sintetizan grandes cantidades de proteínas como las células del páncreas y del hígado; lo cual indica que la cantidad de RNA varía de unas células a otras y dentro de una misma célula en relación con la actividad de la síntesis de proteínas que tiene lugar.

Las diferencias estructurales cualitativas y cuantitativas que presentan los ácidos nucleicos han permitido el desarrollo de técnicas y procedimientos físicos y químicos mediante los cuales se puede hacer su reconocimiento.

La síntesis de las proteínas tiene lugar en los ribosomas (sistema retículo endoplasmático), principalmente. La primera etapa en la síntesis de las proteínas es la activación de los aminoácidos, para lo cual deben reaccionar con el ATP, interviniendo en el proceso la enzima activadora de los aminoácidos. De aquí resulta la formación de un complejo entre la enzima y el mono fosfato de adenosina del aminoácido (E-AMP-AA), en el cual el grupo 5'fosfato del AMP se une al grupo carboxilo del aminoácido, liberándose pirofosfato (P-P) en la reacción.

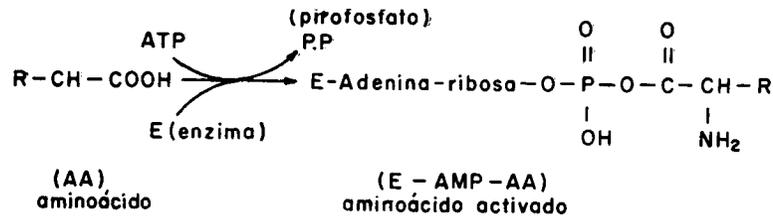


Fig. N° 1. Activación del aminoácido: primera etapa en la síntesis de las proteínas.

Existe una enzima específica para cada aminoácido. En la segunda etapa, el aminoácido activado es transferido al RNA soluble, liberándose en la reacción la enzima activadora y el AMP.

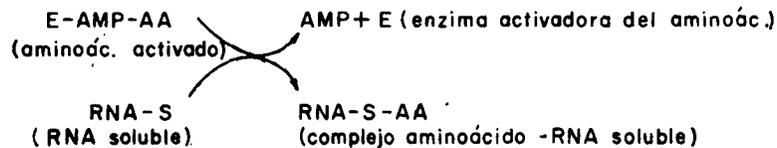


Fig. N° 2. Transferencia del aminoácido activado al RNA-soluble: segunda etapa en la síntesis de las proteínas.

En la tercera etapa, el aminoácido es llevado por el RNA-soluble hasta los ribosomas, donde el RNA-ribosómico, sirviendo de molde, acepta el aminoácido y lo coloca en la cadena polipeptídica, de acuerdo con la secuencia particular que ha sido dictada por el RNA-mensajero. Una vez incorporado el aminoácido a la cadena polipeptídica, el RNA-soluble queda libre y en capacidad de llevar a cabo nuevas transferencias.

Las enzimas llevan a cabo sus funciones dirigidas por los genes. Ha sido posible analizar más directamente la relación entre genes y actividad enzimática; los mejores sistemas de los cuales se han obtenido datos positivos, son aquéllos que gobiernan la producción de enzimas en los microorganismos. Los estudios realizados sobre tales sistemas han llevado al conocimien-

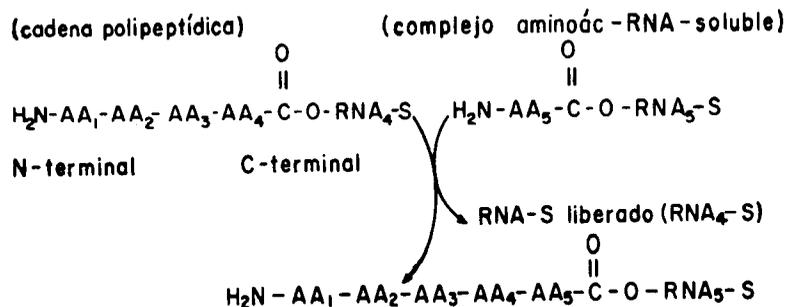


Fig. N° 3. Incorporación del aminoácido a la cadena polipeptídica: tercera etapa en la síntesis de las proteínas.

to de cómo los genes presentes en las células de un organismo pueden actuar específicamente dirigiendo funciones particulares en determinado tiempo y lugar.

En algunas ocasiones, el producto de una reacción enzimática puede inhibir la reacción. Esto significa que la cantidad del producto formado regula la rata de producción del mismo. Este fenómeno ha sido llamado **mecanismo de rebote** (feedback inhibition) y mediante él, la velocidad de producción disminuye cuando el producto de la reacción enzimática es abundante; ocurriendo el fenómeno inverso cuando el producto es escaso.

Un mecanismo más básico es la regulación de la cantidad de enzima por ella misma.

Tomando en cuenta la producción de enzimas en relación con la presencia o ausencia del o de los substratos, podemos hablar de enzimas inducidas y constitutivas.

Las enzimas inducidas, también llamadas adaptativas, son producidas solamente cuando el substrato sobre el cual actúan está presente. Este mecanismo biológico recibe el nombre de **inducción enzimática**, y constituye un eficiente sistema de ahorro de trabajo celular, al no producirse la enzima cuando no hay substrato sobre el cual actuar. El fenómeno de la inducción enzimática ha sido ampliamente estudiado en microorganismos, especialmente bacterias. Frecuentemente (pero no siempre), la sustancia inductora es el substrato de la enzima. El inductor sirve para proveer las condiciones que activan la latencia de una capacidad heredada por la célula, cual es la de producir grandes cantidades de una enzima en particular.

Las enzimas constitutivas, son aquellas cuya concentración dentro de la célula es independiente de la presencia de un agente inductor. Una enzima puede ser constitutiva para un determinado organismo, inducible en otro, o bien no ser ni constitutiva ni inducible (y por consiguiente no existir) en un tercero. Las cé-

lulas capaces de exhibir el fenómeno de inducción de una enzima en particular, siempre contienen un pequeño nivel de la enzima, aun cuando estén creciendo en ausencia del inductor. La extensión con la cual un organismo en particular responde a la presencia de un inductor es determinado genéticamente y varía ampliamente de un organismo a otro. Se pueden observar aumentos en la concentración de la enzima que varían de 2 a 1.000 veces, de acuerdo con el organismo considerado. De tal manera que el material genético de la célula no sólo determina la naturaleza sino también la extensión de la respuesta al agente inductor. Los términos **inducida** y **constitutiva**, pueden ser considerados como términos relativos, al igual que los términos caliente y frío, como representando los extremos de un amplio espectro de respuestas a la adición de un inductor.

Varios compuestos relacionados químicamente pueden inducir una enzima en particular. Además, una sustancia puede servir de inductor de más de una enzima. Este último fenómeno puede observarse en microorganismos y también en animales.

Para que un agente inductor pueda actuar, es necesario que penetre al interior de la célula. En ciertos casos es necesaria la presencia de un sistema transportador del inductor (permeasa). Este sistema transportador o permeasa, puede ser inducido por el mismo inductor de la enzima.

Dos clases de genes intervienen en el control genético de las enzimas, ellos son, los **genes estructurales** y los **genes reguladores**.² Los genes estructurales determinan la producción de una enzima en particular, al establecer la secuencia de los aminoácidos que entran en la formación de esa proteína (enzima); en favor de lo cual podemos señalar que los mutantes de los genes estructurales alteran la naturaleza de la enzima, pero no su tasa de producción. Los genes reguladores, determinan la cantidad producida de una enzima en particular, al inhibir la actividad de los genes estructurales. Los mutantes de los genes reguladores, no alteran la naturaleza de la enzima, pero alteran su tasa de producción. Cuando los genes reguladores faltan o son inactivos, la enzima es producida al máximo, sin control alguno.

F. Jacob y J. Monod,³ de los resultados obtenidos de los estudios sobre *E. coli* en el año de 1961, elaboraron una ingeniosa hipótesis de regulación genética de las enzimas. Sus estudios estuvieron basados en una serie de genes íntimamente relacionados, actuando sobre la lactosa. Cuatro regiones cromosómicas funcionalmente distintas están envueltas en este estudio (Fig. 4). Dos de ellas llevan los genes estructurales, cada una responsable de la producción de una enzima. Un tercer gene es el regulador, cuyo producto inhibe la acción de los genes estructurales. Esto se cumple a través del **operador**, el cual está colocado en la

cuarta región. El operador, en presencia del producto del regulador, suprime la actividad de los íntimamente relacionados genes estructurales, quizás bloqueando la formación del RNA-mensajero. Los genes operadores funcionan como interruptores que ponen en marcha o detienen la actividad de los genes estructurales. El conjunto formado por el operador y los genes estructurales, recibe el nombre de **operón**.

El gene regulador puede producir una sustancia represora, la cual previene que el gene operador actúe, deteniéndose de esta manera la acción de los genes estructurales. Un **efector** del medio puede remover o inactivar el represor y permitir así que el operador actúe sobre los genes estructurales, poniéndose en marcha el mecanismo de producción de las enzimas. Cada gene estructural trasmite su código de información a través de una clase particular de RNA-mensajero y una clase particular de enzima es producida. En presencia de la sustancia sobre la cual actúa la enzima, se detiene el efecto represor del regulador. Quizás el substrato actúe inhibiendo el represor. Cualquiera que sea el mecanismo puesto en juego, los genes estructurales funcionan para producir la enzima cuando el substrato u otro inductor están presentes.

En un experimento de Jacob y Monod,³ las enzimas beta-galactosidasa y galactósido permeasa, representan los productos de los genes estructurales. El efector fue la presencia de un galactósido en el medio. Cuando el efector no está presente, el represor toma contacto con el operador y los genes estructurales permanecen inactivos. Si por el contrario el efector está presente, modifica al represor en tal sentido, que éste último no se asocia con el operador y los genes estructurales cumplen sus funciones, elaborándose beta-galactosidasa y galactósido permeasa. Si una mutación tiene lugar en el gene operador, haciéndolo no funcional, los genes estructurales adyacentes no permanecerían más bajo su control y presumiblemente podrían ser siempre funcionales. Si por el contrario, el gene operador se torna funcional, los genes estructurales nunca funcionarían. El operón representa pues, grupos de genes estrechamente ligados provistos de mecanismos encadenados que les permiten controlar su propia actividad.

El descubrimiento de sub-unidades dentro de los genes y la diferenciación entre genes reguladores y estructurales, ha sugerido la modificación de la hipótesis "un gene-una enzima". Una versión más moderna y acorde con los últimos conocimientos adquiridos, sería "un gene estructural-un RNA mensajero-un polipéptido". Esto no implica que estas unidades operen independientemente. Un simple regulador puede controlar una serie completa de reacciones encadenadas; o lo que es lo mismo, un sitio genético (gene locus) puede controlar varios otros. El regulador

no es necesariamente una entidad especial y separada; puede estar colocada simplemente en el principio del DNA, o estar a cierta distancia de los genes estructurales que él controla.

Haciendo una aplicación del esquema de Monod y colaboradores, sobre la información y regulación genética transmitida en la síntesis de proteínas, Kepes,⁴ al añadir un agente inductor, como lo es el metil-beta-D-tio galactósido (MTG), a un cultivo de *E. coli* en crecimiento, considera que la siguiente secuencia de etapas tiene lugar desde la adición del inductor hasta la formación de la proteína (enzima inducida):

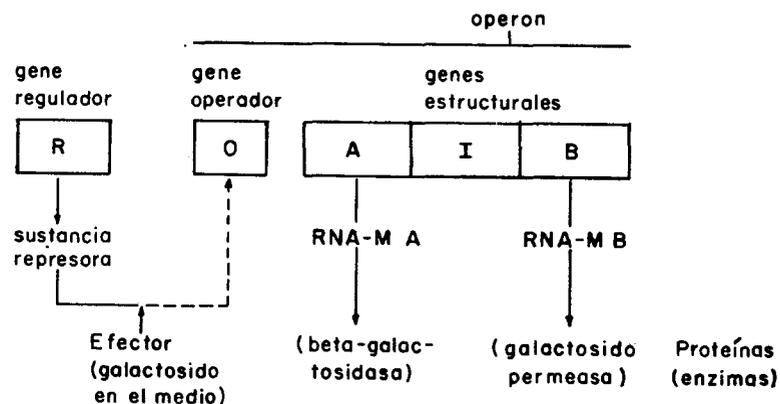


Fig. N° 4. Modelo de control de la acción de los genes en *E. Coli* que ilustra las relaciones entre regulador, operador y genes estructurales (de Jacob y Monod).

- 1 — Penetración del agente inductor al interior de la célula.
- 2 — Reacción (o interacciones) del inductor con un represor, llevando a la inactivación del represor. Esta etapa sería llamada de **inducción**.³
- 3 — Síntesis de un RNA-mensajero de corta duración, el cual contiene la información acumulada en el DNA. Esta etapa corresponde a la **primera transcripción**.⁵
- 4 — Transferencia del RNA-mensajero desde el DNA (núcleo), hasta los ribosomas (citoplasma); sitio donde tiene lugar la síntesis de las proteínas.
- 5 — Síntesis del polipéptido correspondiente a una enzima específica en el ribosoma, usando la información contenida en el RNA-mensajero. Esta etapa corresponde a la **segunda transcripción**.
- 6 — Establecimiento de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, correspondientes a la forma activa de la proteína. Esta última etapa incluye el ensamblaje

específico de sub-unidades (por ejemplo, de monómeros de beta-galactosidasa); o la incorporación dentro de estructuras sub-celulares (por ejemplo, incorporación de la proteína permeasa en la estructura de la membrana celular).

De los resultados obtenidos, Kepes⁴ concluye que la síntesis del RNA-mensajero se detiene inmediatamente después de retirar el inductor del medio de cultivo. De suerte que la fase considerada como **dependiente del inductor**, incluye las etapas 1, 2 y 3; mientras que la segunda fase considerada como **independiente del inductor**, incluye las etapas 4, 5 y 6. Así que las etapas principales de las 2 fases experimentales diferenciables son, la primera y la segunda transcripciones (etapas 3 y 5).

La investigación científica, ha aportado muchos conocimientos en relación con la acción de las radiaciones ionizantes sobre la materia viva, y en particular sobre el material genético: DNA y RNA.

Las radiaciones ionizantes constituyen una parte del espectro de radiaciones, extendiéndose desde los rayos X blandos (de longitud de onda del orden de los 2 angstroms), hasta los rayos X duros, rayos gamma (de longitud de onda de menos de 0.01 angstrom) y los rayos cósmicos (las radiaciones de más alta energía y más corta longitud de onda).⁶ Las radiaciones ionizantes pueden ser de tipo electro-magnético (rayos X y rayos gamma) o corpusculares (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas alfa).

La mayoría y las más poderosas fuentes generadoras de radiaciones ionizantes son creación del hombre. También existen en la naturaleza pequeñas fuentes de tales radiaciones: trazas de isótopos radiactivos presentes en la materia viva e inanimada. Los rayos cósmicos constituyen otro tipo de radiaciones naturales.

El término de **radiaciones ionizantes**, se debe precisamente al hecho, amplia y satisfactoriamente establecido, de que tales radiaciones, al actuar sobre la materia, determinan la producción de iones (llamados radicales libres); como consecuencia de la liberación de electrones planetarios de los átomos o moléculas. Los iones formados como consecuencia de tal acción, son en general de muy corta duración y altamente reactivos. Los radicales libres obtenidos de moléculas orgánicas complejas, son a menudo de más larga duración.

Parte de la energía de las radiaciones ionizantes se deriva para la formación de moléculas excitadas; éstas por lo general son inestables y tienden a la disociación prontamente.

Existen dos mecanismos mediante los cuales las radiaciones ionizantes pueden engendrar cambios en la materia, a saber:

- a — acción directa, cuando la molécula es ionizada o excitada por el paso de electrones.
- b — acción indirecta, cuando la molécula no absorbe energía directamente de las radiaciones, sino indirectamente de otra molécula.

Al considerar el efecto de las radiaciones ionizantes (o de alta energía como también se designan), sobre la materia viva (protoplasma celular), hay que tomar en cuenta el momento o estado fisiológico en que se encuentra el organismo en consideración; pues ha sido demostrado en forma amplia por ejemplo, que el oxígeno es un factor que modifica considerablemente el efecto de las radiaciones ionizantes sobre el protoplasma vivo.

Pollard⁷ en 1961 hizo la sugerencia de que una de las principales acciones llevadas a cabo por las radiaciones ionizantes, estaba en relación con la transcripción del mensaje genético del DNA al RNA. Esta idea ha recibido soporte experimental de los numerosos trabajos llevados a cabo sobre bacterias y otros organismos inferiores. El mismo Pollard y Vogler,⁷ usando una cepa de *E. coli*, demostraron que había cierto grado de sensibilidad a las radiaciones, en relación con el fenómeno de inducción enzimática. En efecto Clayton y Adler,⁸ demostraron que la síntesis inducida de la catalasa en *Rhodopseudomonas Spheroides*, es inhibida por pequeñas dosis de radiaciones.

El interesante fenómeno de la transcripción genética, elegantemente descrito por Jacob y Monod, y Gros (y del cual ya hemos dado cuenta), se encuentra íntimamente ligado con el no menos interesante fenómeno de la inducción enzimática (cuya esquematización se debe a Kepes), como que el primero puede considerarse incluido en el segundo, de acuerdo con lo propuesto por Kepes.

El RNA-mensajero resultante de la primera transcripción (Gros y col.), una vez cumplido su papel en la síntesis de la cadena polipeptídica a nivel del ribosoma, degenera por un proceso no muy claro, aunque los estudios de Pollard⁹ sobre la degeneración del RNA-mensajero en relación con la temperatura, sugieren que el fenómeno es de naturaleza enzimática (degradación enzimática) y no debido a una simple inactivación de orden físico. Kepes demostró que la vida media del RNA-mensajero que interviene en la formación de la enzima beta-galactosidasa es de 1.02 minutos a 37 grados C de temperatura, y de 2.05 minutos a 25 grados C. El tiempo que media entre el fenómeno de la inducción y la puesta en evidencia de la actividad de la enzima inducida, es de 3 minutos aproximadamente.

Si consideramos que el fenómeno de la transcripción es sensible a las radiaciones ionizantes, aquellas células que han

sido sometidas al fenómeno de la inducción y que luego son irradiadas, mostrarán una producción de enzimas que estará en relación con el RNA-mensajero formado, y cuyo tiempo de producción enzimática se extenderá hasta que el RNA-mensajero degenere. Esto fue comprobado por los trabajos de Clayton y Adler. Como ya ha sido establecido de una manera general en los estudios de la acción de las radiaciones ionizantes sobre la materia viva, la presencia de oxígeno en el medio, aumenta considerablemente la sensibilidad del fenómeno de la transcripción genética a la acción de dichas radiaciones.

Los trabajos de Pollard y Kepes, permitieron hacer algunas determinaciones de la vida media del RNA-mensajero.

Pollard procedió de la siguiente manera:

Células de *E. coli* B o *E. coli* 15 Thy Leu, son cultivadas en un medio mínimo, conteniendo maltosa como fuente de carbono. Este medio no determina represión de la formación de enzimas, pero tampoco la induce. Cuando las células están a una concentración entre 5×10^7 y 1×10^8 por mililitro, son inducidas por adición de un mililitro de tio-metil-galactósido al 0.2%, para 20 mililitros de cultivo. La concentración de las células a irradiar debe ser conservada relativamente baja. A concentraciones altas las células son mucho menos sensitivas por razones no del todo conocidas, pero se cree que pueda ser debido parcialmente al efecto producido por el oxígeno disuelto y a la formación de peróxidos de larga duración en el medio de cultivo. Pocos minutos después de inducidas, las células son irradiadas en una fuente de cobalto radiactivo (Co^{60}), siendo la dosis alrededor de 13.500 r, lo cual toma aproximadamente dos y cuarto minutos. Mientras tanto se toman muestras de 1 mililitro, cada 2 minutos, del medio de cultivo irradiado y de uno no irradiado que sirve de testigo; en las muestras tomadas se ensaya la actividad de la beta-galactosidasa, poniendo 1 mililitro de la muestra en 4 mililitros de agua destilada helada conteniendo una gota de tolueno y 1 gota de detergente (Sarkosyl) al 2%). Las muestras son vigorosamente agitadas a intervalos, por 1 hora y luego colocadas en baño de agua a 34 grados C. Luego se añade a cada tubo o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido y se permite el desarrollo de un color amarillo, adecuado para la lectura; el tiempo de la prueba se registra. La reacción se detiene con carbonato de sodio 0.5 M y el porcentaje de transmisión se lee en un espectrofotómetro Bausch & Lomb en una longitud de onda de 420 milimicras. Se usa una curva de calibración con cantidades conocidas de enzima para derivar unidades arbitrarias de la actividad enzimática. La figura N° 5, muestra los resultados del experimento.

La formación del RNA-mensajero continuó por 2 minutos después del tiempo medio de irradiación, y luego se detuvo. La de-

generación del RNA-mensajero, se indica en la figura por la disminución en la producción de la enzima hasta su completa detención; seguida luego por la síntesis a una rata reducida. Esto último puede ser debido a la formación de nuevo DNA.

Del análisis matemático del desarrollo de la cinética enzimática, se pudo determinar la vida media del RNA-mensajero.

El cuadro N° 1 representa el estudio de los resultados obtenidos en varios experimentos; al mismo tiempo se establecen comparaciones con los obtenidos por otros autores.

Temp. (C)	Temp. ($10^{-3} \times 1 / K^{\circ}$)	Vida media (min)	const. de degrad. k_1 (min^{-1})	a mol/célula
10	3.45	8.1	0.085	9.1×10^{-3}
17	3.45	5.7	.12	6.8×10^{-3}
20	3.42	3.8	.18	1.8×10^{-2}
25	3.35	1.9*	.36	0.28
30	3.31**	2.7***	.26	.63
37	3.23	0.80**	.86	4.2
42	3.18	0.80	.86	2.9
45	3.14	0.70	1.0	13.5

CUADRO N° 1 — Rata de degradación del RNA-mensajero (k_1) y rata de transcripción del DNA; a, moléculas RNA-mensajero por célula y por minuto a diferentes temperaturas.

* Comparar con los resultados de Kepes. Kepes, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **76**: 293 (1963).

** Comparar con los resultados de Levinthal y col. Levinthal, C., Keynan, A., Higa, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **48**: 1.631 (1962).

*** Comparar con los resultados de Nakada y Magasanik. Nakada, D., and Magasanik. *B. J. Mol. Biol.*, **8**: 105 (1964).

Los resultados obtenidos por Pollard (Fig. N° 5), están de acuerdo con la idea general que la irradiación inhibe la transcripción genética, en una forma parecida a la obtenida cuando el inductor es separado del medio de cultivo (tal como lo demuestra Kepes en su trabajo); y aunque el resultado es el mismo, los mecanismos operantes son totalmente diferentes. La figura N° 6, representa los resultados obtenidos por Kepes, del estudio de la inducción de la beta-galactosidasa, en relación con el tiempo de dilución (lo cual equivale a retirar el agente inductor, del medio de cultivo).

La hipótesis de que las radiaciones ionizantes, inhiben el fenómeno de la transcripción genética en las bacterias, se basa en una serie de experimentos llevados a cabo por Pollard y Achey,¹⁰ sobre *E. coli*. Dichos autores, demostraron que las radiaciones ionizantes, producen la degradación del DNA hasta en un 50%, y además una reducción en la síntesis del mismo.

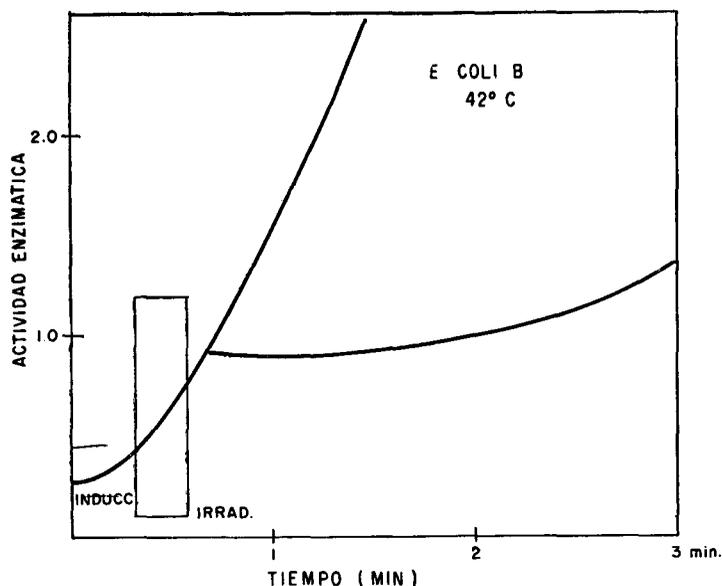


Fig. 5.—

A un cultivo de *E. coli*, cepa B, que había sido cultivado previamente en maltosa, se le añadió tio-metil-galactósido (TMG), como agente de inducción, al tiempo cero. Se permitió entonces que creciera a 42 grados C. y fue luego irradiado en una fuente de cobalto (Co^{60}) durante dos minutos y cuarto, administrándosele una dosis de 13,500 r. La actividad de la beta-galactosidasa fue medida en 1 mililitro de cultivo que se tomó a varios intervalos, de este cultivo y de otro no irradiado que sirvió de control. La producción de enzima continuó por corto tiempo después de la irradiación, y entonces cesó. De la cinética de este fenómeno enzimático, pudo determinarse la vida media del RNA-mensajero. Más tarde la actividad enzimática empezó a aumentar, presumiblemente debido a la formación de nuevo DNA. Tomado de Pollard. *Science*, 146: 927. 1964.

La degradación del DNA por las radiaciones ionizantes fue demostrada por Stuy, en microorganismos. Otros autores también han reportado trabajos sobre la degradación del DNA por las radiaciones ionizantes.

La irradiación por rayos X causa la degradación del DNA, cuando un cultivo de *E. coli*, es sometido a la acción de dichas radiaciones. Stuy,¹¹ observó un fenómeno de saturación en el efecto de las radiaciones, puesto que se obtiene casi el mismo grado de degradación del DNA, cuando se emplean dosis altas de rayos X que cuando se emplean dosis relativamente bajas.

Varias hipótesis fueron emitidas para explicar el fenómeno de saturación;¹² en una se supone que hay dos clases de DNA, uno sensitivo y otro resistente a la acción de las radiaciones; en

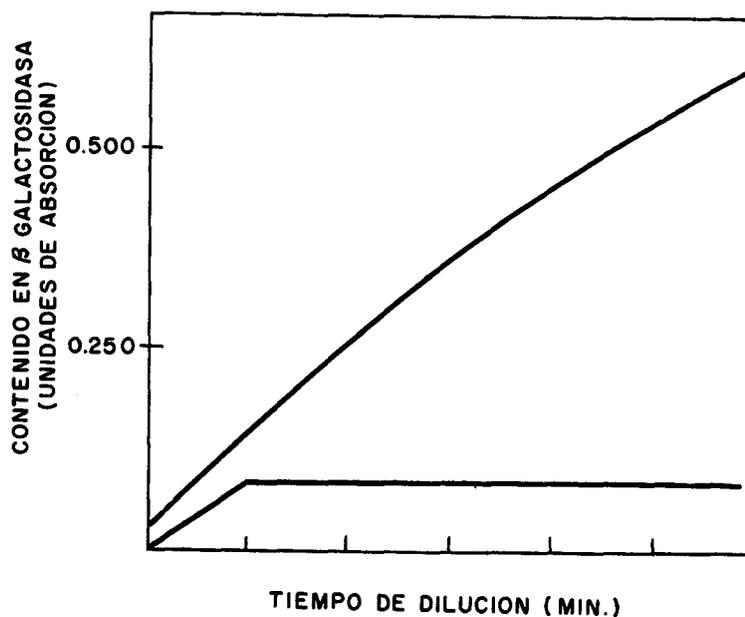


Fig. 6.—

Rendimiento de beta-galactosidasa en función del tiempo de contacto con el inductor. Se añadió IPTG (isopropil-beta-D-tio-galactósido) 0.25 mM, al tiempo cero, a un cultivo de *E. coli* ML₁ en fase de crecimiento exponencial. Se diluyeron alíquotas de 0.1 ml con 5 ml de medio de cultivo precalentado sin agente inductor y posteriormente se incubaron. La toluenización comenzó a los 18 minutos en todas las muestras. El contenido en beta-galactosidasa es llevado al gráfico sobre el tiempo de dilución. Tomado de Kepes. *Biochim. Biophys. Acta*, 76: 293. 1963.

otra hipótesis se establece que hay dos vías diferentes de replicar el DNA, una de ellas siendo sensible a los rayos X. También es posible suponer que la irradiación por rayos X determina la activación de algunas nucleasas las cuales serían rápidamente inactivadas o bloqueadas. Stuy no encontró activación de la DNAasa en sus experimentos. Sin embargo existe la posibilidad, de que otras nucleasas (como las fosfodiesterasas), actuando solamente sobre una cadena del DNA, sean activadas. El mismo efecto podría ser obtenido si un proceso fuera inducido después de irradiación, el cual progresivamente estabilizaría o protegería al

DNA de la degradación. Finalmente se puede suponer, que las dos funciones del DNA (genética y fisiológica), están separadas, y que solamente una de ellas sea sensible a la acción de los rayos X. Después de la irradiación, el DNA que entra en sus funciones fisiológicas, presumiblemente degradaría, mientras que el DNA replicado (función genética), sería relativamente resistente.

Administrando dos dosis de rayos X, con un intervalo entre una y otra dosis, se podría determinar cual de las dos últimas hipótesis es cierta. Así, si las dos funciones del DNA estuvieran separadas y solamente una de ellas fuera sensitiva a los rayos X, entonces, después de la primera dosis, el DNA que no ha sido degradado y que está en fase de resistencia, podría entrar en el segundo ciclo de actividad y tornarse sensible a la irradiación.

Cuanto mayor sea el intervalo entre la primera y la segunda irradiación, mayor será la posibilidad de que el DNA previamente resistente, entre en la fase sensitiva, y por consiguiente, mayor será la posibilidad de ser degradado con la segunda dosis de rayos X. Si por el contrario, la irradiación induce (aparte del proceso degradativo), un proceso progresivamente opuesto al efecto de las radiaciones ionizantes; entonces lógicamente la segunda dosis de rayos X, sería cada vez menos eficaz para producir la degradación del DNA.

De los experimentos de Stuy, se deduce que esta hipótesis es la más probable, y que la irradiación induce un proceso que previene o detiene la degradación del DNA.

Aunque los experimentos de Stuy, no excluyen otras posibles explicaciones del fenómeno de saturación del proceso degradativo, es sin embargo evidente que algún proceso que previene o detiene la degradación del DNA, aparece después de la irradiación. Dado que el fenómeno de la degradación puede ser prolongado por la adición de cloramfenicol, es probable que esto sea debido a una inhibición del proceso regenerativo.

Los trabajos de Pollard y Achey fueron llevados a cabo empleando también *E. coli*. Como efecto máximo de las radiaciones ionizantes, se obtuvo una degradación del DNA equivalente al 50%. En estos experimentos se pudo comprobar una vez más, que la presencia de oxígeno, aumenta considerablemente la sensibilidad del protoplasma vivo a la acción de las radiaciones ionizantes. Como agente de control se utilizó el nitrógeno, y aunque el efecto máximo en la degradación del RNA se obtuvo empleando las mismas dosis prácticamente de radiación en presencia de oxígeno que de nitrógeno, cuando se administran dosis relativamente bajas, para obtener el mismo efecto degradativo, se necesita que la dosis de irradiación sea cuatro veces mayor en presencia de nitrógeno que de oxígeno. También se concluye de los trabajos de Pollard y Achey que la acción de las radiaciones en

la degradación del DNA, es debido en parte a un proceso de sensibilización a alguna clase de acción enzimática, y que se encuentra en relación con la síntesis de proteínas.

Que hay una reducción en la síntesis del DNA como consecuencia de la acción de las radiaciones ionizantes, ha sido demostrado por Billen¹³ y también por Pollard y Vogler.

Billen, trabajando con *E. coli*, demostró que después de sometida a la acción de las radiaciones ionizantes, disminuye la síntesis de DNA. La síntesis de este ácido nucleico en una célula irradiada, una vez iniciada puede llegar a ser completa, pero sin síntesis adicional de proteína y RNA, requisito este último indispensable antes de iniciarse el nuevo ciclo de síntesis del DNA y de división celular.

Que la síntesis del DNA se encuentra disminuida en las células sometidas a irradiación, se comprobó por la incorporación de 5-bromo-uracilo al DNA, en sustitución de la timina. El aislamiento del DNA, reveló que la mitad correspondía al DNA sustituido (híbrido) y la otra mitad al DNA normal. Igualmente el aislamiento de DNA marcado con bromo-uracilo C¹⁴, reveló que el total marcado se encuentra solamente en el DNA híbrido. No se encontró DNA completamente substituido, lo cual demuestra que el DNA conteniendo 5 bromo-uracilo, no estuvo en futuras réplicas. Estos datos soportan la tesis de que la réplica del DNA procede hasta completarse y no tiene lugar adicionalmente durante la incubación.

Pollard y Achey estudiaron, en microorganismos irradiados, la síntesis del DNA utilizando timina marcada. Con dosis relativamente bajas de irradiación, la síntesis del DNA continúa a una rata apreciable, siendo mayor en una atmósfera de nitrógeno que de oxígeno. La síntesis disminuye considerablemente a los 60 minutos y continúa a una rata prácticamente invariable, pero si el medio está oxigenado, la síntesis se detiene pronto. Utilizando dosis de irradiación más altas, el efecto es mucho más marcado. De los estudios de Pollard y Achey se concluye, que como en el caso de la degradación del DNA, en la síntesis del mismo la presencia o ausencia de oxígeno es un factor que modifica los resultados, estando la relación de la dosis a utilizar en presencia de nitrógeno y oxígeno en la proporción de 1,5 es a 1. Es interesante observar como lo demuestra Billen, que la detención en la síntesis parece estar asociada con el tiempo de división celular.

Las figuras Nº 7A y 7B muestran los resultados de Pollard y Achey.

Es ampliamente conocido el importante papel que desempeñan las enzimas en el metabolismo del protoplasma vivo. La mayoría de las proteínas conocidas poseen propiedades enzimáticas y llevan a cabo sus funciones dirigidas por los genes. La

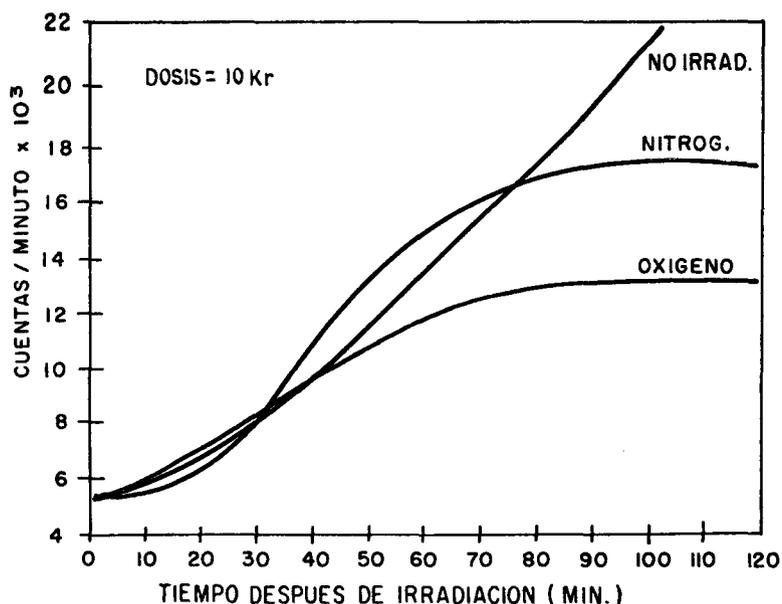


Fig. 7a.—

Muestra el efecto de la irradiación con Co^{60} en la síntesis del DNA en *E. coli*. A las células se les administró una dosis de 10Kr en presencia de oxígeno y nitrógeno. Tanto antes como después de la irradiación había timina marcada con C^{14} en el medio. La cantidad de C^{14} en la fracción insoluble en ácido tricloro acético frío, aumenta después de la irradiación, hasta un tiempo bastante aproximado al tiempo de división celular; después de lo cual no hay aumento adicional. Tomado de Pollard y Achey. *Science*, 146: 71. 1964.

síntesis de las enzimas en las bacterias, sigue un doble control genético. Los llamados genes estructurales, determinan la organización molecular de las proteínas, al establecer la secuencia de los aminoácidos que entran a formar parte de la cadena polipeptídica; otros genes llamados reguladores, controlan la rata de producción de las proteínas a través de componentes intermedarios de origen citoplásmico o represores. Los represores pueden ser inactivados (inducción) por ciertos metabolitos específicos. Este sistema de regulación opera directamente por la síntesis de un intermedario de corta duración o mensajero (RNA-mensajero), el cual viene a estar asociado con los ribosomas, sitio donde tiene lugar la síntesis de las proteínas (enzimas). En el esquema elaborado por Monod y colaboradores, sobre la información y regulación genética transmitida en la síntesis de las proteínas, ampliado luego por Kepes para considerar la acción de los agentes inductores de la síntesis enzimática, se consideran dos tipos de transcripción: la primera transcripción corresponde a la síntesis del RNA mensajero de corta duración, el cual contiene la información acumulada en el DNA; la segunda transcripción correspon-

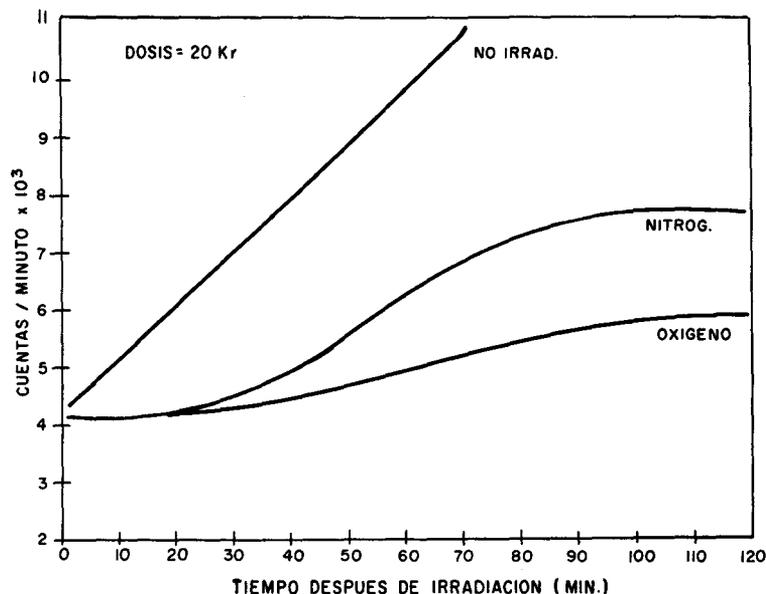


Fig. 7b.—

Muestra el efecto de la irradiación sobre la síntesis del DNA en *E. coli*, usando 20 Kr con Co^{60} como fuente de radiación. Tomado de Pollard y Achey. *Science*, 146: 71. 1964.

de a la síntesis del polipéptido a nivel del ribosoma, siguiendo las instrucciones del RNA-mensajero.

Las radiaciones ionizantes interfieren con el fenómeno de la transcripción genética en las bacterias, es decir, inhiben la transcripción genética. Esta inhibición se debe a la degradación del DNA, que puede llegar hasta un 50%, y a una disminución en la síntesis del referido ácido nucleico.

Como consecuencia de esta inhibición, hay una disminución considerable en la síntesis del RNA y de las proteínas. Estos hechos demuestran a las claras la importancia que sobre la fisiología celular bacteriana, tiene el fenómeno inhibitorio de la transcripción genética por acción de las radiaciones ionizantes.

La presencia de oxígeno, modifica los efectos de la irradiación, al aumentar la sensibilidad de la bacteria irradiada. Otro factor a considerar, además del oxígeno, es la temperatura, la cual modifica la vida media del RNA-mensajero.

Muy interesante es el fenómeno de saturación, observado por Stuy, que consiste en la inducción por las mismas radiaciones, de un proceso que previene o detiene la degradación del DNA. Este fenómeno tiene lugar aún empleando pequeñas dosis de radiaciones, y parece estar íntimamente conectado con la síntesis de proteínas, pues el cloramfenicol, antibiótico que detiene la síntesis proteica, prolonga la degradación del DNA.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 HARPER, H., Review of Physiological Chemistry, 9th edition. Lange, 1963.
- 2 GARDNER, E., Principles of Genetics, 2nd edition, Willey, 1964
- 3 JACOB, F., and MONOD, J., J. Mol.-Biol., **3**, 318 (1961).
- 4 KEPES, A., Biochim. Biophys. Acta, **76**, 293 (1963).
- 5 GROS, F.; HIATT, H.; GILBERT, W.; KURLAND, C.; RISE-BROUGH, R., and WATSON, J., Nature, **190**, 581 (1961).
- 6 BACQ, Z., and ALEXANDER, P., Fundamentals of Radiobiology, Butterworths, (1955).
- 7 POLLARD, E., and VOGLER, C., Radiation Res., **15**, 109 (1961).
- 8 CLAYTON, R., and ADLER, H., Biochim. Biophys. Acta, **56**, 257 (1962).
- 9 POLLARD, E., Science, **146**, 927 (1964).
- 10 POLLARD, E., and ACHEY, P., Science, **146**, 71 (1964).
- 11 STUY, J., Radiation Res., **14**, 57 (1961).
- 12 MILETIC, B.; KUCAN, Z., and NOVAK, D., Nature, **202**, 106 (1964).
- 13 BILLEN, D., Biochim. Biophys. Acta, **72**, 608 (1963).

La investigación sólo puede existir si está en manos de hombres de ciencia bien preparados. Dar recursos a los incapacitados es malgastar el dinero y engendrar una burocracia improductiva de mediocres envanecidos.

BERNARDO A. HOUSSAY
"La investigación científica".