**EFEITO DA 8-METOXIPSORALEINA ASSOCIADA À
LUZ ULTRAVIOLETA LONGA EM PROFAGOS E PLASMÍDIO
DE *Staphylococcus aureus***

JOSÉ PINTO DE SIQUEIRA JÚNIOR

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1981

CURRICULUM VITAE

JOSÉ PINTO DE SIQUEIRA JÚNIOR, filho de José Pinto de Siqueira e Lidia Pinto de Siqueira, natural de Piracicaba, São Paulo, onde nasceu a 13 de fevereiro de 1951, é Bacharel em Ciências Biológicas, modalidade médica pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (14 de dezembro de 1973) e Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (04 de agosto de 1976). Foi Monitor junto ao Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da FMRP/USP durante o ano de 1971; exerceu atividades docentes na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras "Barão de Mauá" de Ribeirão Preto durante os anos de 1972 e 1973; foi Docente Voluntário junto ao Departamento de Genética da ESALQ/USP de fevereiro de 1975 a abril de 1977 e, desde então é Docente da Universidade Federal da Paraíba, lotado no Departamento de Biologia do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, como Professor Colaborador até janeiro de 1978 e posteriormente, por Concurso de Títulos e Provas, como Professor Assistente. É sócio da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciências desde julho de 1970, da Sociedade Brasileira de Genética desde julho de 1972 e da Sociedade Brasileira de Microbiologia desde maio de 1977.

in memoriam

Cap. JOSÉ PINTO DE SIQUEIRA

1907 - 1976

Prof. DEMOSTHENES SANTOS CORRÊA

1913 - 1980

A

Lillian

PREFÁCIO

O presente trabalho, que advém de projeto incluído no Programa Integrado de Genética do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo 2222.1362/77 e 40.0570/80), teve seus experimentos preliminares realizados no Laboratório de Genética do Departamento de Biologia/CCEN da UFPb e posteriormente foi desenvolvido no Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética/ESALQ/USP, sendo que a eletroforese foi realizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, campus de Jaboticabal e as fagotipagens na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Às instituições mencionadas o nosso reconhecimento, bem como à UFPb, através da PRPG e do Departamento de Biologia/CCEN, pela oportunidade oferecida e à CAPES pela bolsa concedida (PICD).

Recebemos ainda, durante o Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, o apoio decisivo de uma série de pessoas e entidades, às quais gostaríamos de expressar os agradecimentos. Aos Drs. João Lúcio de Azevedo, Flávio César Almeida Tavares e Ernesto Paterniani, do Departamento de Genética/ESALQ/USP. Aos Drs. Carlos Solé-Vernin, da FMRP/USP, Manoel Victor Franco Lemos da FCAV/UNESP, Jaboticabal e Sérgio Olavo Pinto da Costa do IB/USP, pela disposição de sempre colaborar. Aos Profs. José Carlos da Silva e Edval de Souza Maciel, do Departamento de Biologia/CCEN, pela oportunidade oferecida.

tamento de Biologia/CCEN/UFPb, pelas providências durante nosso afastamento. Aos funcionários do Instituto e Departamento de Genética/ESALQ / USP, em particular aos do Setor de Genética de Microrganismos. Aos colegas do CPG Genética e Melhoramento de Plantas. Ao Environmental Mutagen Information Center (Oak Ridge, USA), ao Centro de Informações Nucleares, à Coordenação de Atividades Culturais da USP (DBD/SIR) e às Bibliotecas da ESALQ/USP, pelo apoio bibliográfico.

Piracicaba, novembro de 1981

J.P.S.Jr.

EFEITO DA 8-METOXIPSORALEINA ASSOCIADA À LUZ ULTRAVIOLETA
LONGA EM PROFAGOS E PLASMÍDIO DE *Staphylococcus aureus*

José Pinto de Siqueira Júnior

Orientador: *João Lúcio de Azevedo*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a 8-metoxipsoraleina associada à luz ultravioleta longa (8MOP-UVL) na indução de profagos, na cura do profago responsável pela supressão da atividade lipolítica e na cura do plasmídeo responsável pela resistência à tetraciclina, na linhagem 609tet-r de *Staphylococcus aureus*.

As frequências de indução de profagos, após irradiação por UVL, na presença de 8MOP, quando lançadas em gráfico, em função da dose, revelaram uma curva de dose-efeito típica, de há muito conhecida para outros sistemas lisogênicos. Para as condições experimentais utilizadas, a frequência máxima de indução foi maior que aquela obtida após irradiação por luz ultravioleta curta (UVC).

Após irradiação por UVL, na presença de 8MOP, a partir da linhagem lip^- utilizada, variantes lip^+ foram obtidas com frequências maiores que as obtidas espontaneamente, sendo o tratamento tão eficiente quanto

to a UVC. Fagotipagem e experimentos de conversão fágica evidenciaram a ocorrência de cura do profago, detectando-se assim mais um efeito biológico da associação 8MOP-UVL em bactérias.

Após tratamento com 8MOP-UVL, variantes sensíveis à tetraciclina foram obtidas com frequências maiores que as obtidas espontaneamente ou sob ação de temperatura elevada ou brometo de etídio. Com as variantes sensíveis e com a linhagem original, foi feita eletroforese de DNA em gel de agarose e o resultado mostrou que concomitante ao desaparecimento do caráter fenotípico, houve também desaparecimento de uma banda que pôde ser identificada como relativa ao plasmídeo portador do gene para resistência a tetraciclina. Assim a associação 8MOP-UVL poderia ser considerada como um novo agente capaz de eliminar plasmídios de *S.aureus*.

EFFECT OF 8-METHOXYPsorALEN PLUS NEAR ULTRAVIOLET LIGHT
ON PROPHAGES AND PLASMID OF *Staphylococcus aureus*

José Pinto de Siqueira Júnior

Adviser: *João Lúcio de Azevedo*

SUMMARY

The present research was aimed to evaluate the association of 8-methoxypsoralen plus near ultraviolet light (8MOP-NUV) on induction of prophages and cure of the prophage responsible for suppression of the lytic activity on *Staphylococcus aureus*. The same association was also investigated on the cure of the plasmid responsible by tetracycline resistance on the used strain 609tet-r.

The prophage induction frequencies after NUV irradiation associated to 8MOP treatment have shown in a graphic a typical dose-effect curve also known for other lysogenic systems. For the experimental conditions the maximum frequency of induction was greater than that obtained after far ultraviolet light irradiation (FUV).

After 8MOP-NUV treatment, variants lip^+ were obtained from the lip^- strain used, in frequencies which were greater than those achieved spontaneously. This treatment was as efficient as the FUV one. Bacteriophage typing and experiments of phage conversion have shown that

cure of prophage was achieved. This can be considered one additional biological effect of 8MOP-NUV association.

Following 8MOP-NUV treatment, variants which were tetracycline sensitive were obtained. The observed frequencies were higher than those achieved spontaneously or after ethidium bromide and high temperature treatments. Gel agarose electrophoresis were carried out from the original strain and non-resistant variants lysates. The results have shown that loss of resistance correspond to a loss of a band on agarose gel which must correspond to the plasmid carrying the tetracycline resistance gene. In this way 8MOP-NUV association can be considered as another agent able to eliminate plasmids from *S. aureus*.

I N D I C E

	<u>PÁGINA</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.	12
2.1. Bactérias	12
2.2. Meios de cultivo.	13
2.3. Diluentes	15
2.4. Drogas.	15
2.5. Tratamento pela associação 8-metoxipsoraleína - luz ultra violeta longa (8MOP-UVL).	16
2.5.1. Indução de profago	16
2.5.2. Obtenção de variantes <i>lip</i> ⁺	17
2.5.3. Eliminação de resistência à tetraciclina	17
2.6. Tratamento pela luz ultravioleta curta (UVC).	18
2.6.1. Indução de profago	18
2.6.2. Obtenção de variantes <i>lip</i> ⁺	18
2.7. Tratamento pelo brometo de etídio e pela temperatura ele- vada.	19
2.8. Obtenção de lisado.	19
2.9. Conversão fágica.	20

	<u>PÁGINA</u>
2.10. Fagotipagem.	20
2.11. Eletroforese de DNA em gel de agarose.	21
3. RESULTADOS.	22
3.1. Efeitos da 8MOP-UVL	22
3.2. Efeitos da UVC.	26
3.3. Efeitos do brometo de etídio e da temperatura elevada . .	29
3.4. Conversão fágica.	29
3.5. Fagotipagem	30
3.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose	30
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	34
4.1. Da indução de profagos.	34
4.2. Da cura de profagos	36
4.3. Da cura de plasmídeo.	39
5. LITERATURA CITADA.	44

LISTA DAS TABELAS

<u>TABELA</u>	<u>PÁGINA</u>
1 - Sobrevivência da linhagem 609 ^{tet-r} de <i>Staphylococcus aureus</i> após irradiação por UVL na presença e na ausência de 8MOP.	23
2 - Indução de profagos na linhagem 609 ^{tet-r} de <i>Staphylococcus aureus</i> , após irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP.	
3 - Obtenção de variantes <i>lip</i> ⁺ a partir da linhagem 609 ^{tet-r} de <i>Staphylococcus aureus</i> , após irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP.	25
4 - Eliminação de resistência à tetraciclina na linhagem 609 ^{tet-r} de <i>Staphylococcus aureus</i> após irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP.	26
5 - Sobrevivência, indução de profagos e obtenção de variantes <i>lip</i> ⁺ na linhagem 609 ^{tet-r} de <i>Staphylococcus aureus</i> , após irradiação por UVC.	27
6 - Reatividade de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a fagos tipadores a 100 X RTD.	32
7 - Obtenção de variantes <i>lip</i> ⁺ a partir de linhagem <i>lip</i> ⁻ de <i>Staphylococcus aureus</i> (PS85), após tratamento por agentes químicos (SIQUEIRA JR. e AZEVEDO, 1980).	37
8 - Eliminação de resistência à tetraciclina em <i>Staphylococcus aureus</i>	40

LISTA DAS FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>PÁGINA</u>
1 - Colônias <i>lip</i> ⁻ e <i>lip</i> ⁺ (halo) de <i>Staphylococcus aureus</i> em ágar tween-cálcio.	14
2 - Diferentes placas de lise causadas por fagos isolados da linhagem 609 <i>tet-r</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre a indicadora PS83A. (aumento 1X)	24
3 - Sobrevivência e indução de profagos em função do tempo de irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP, e em função do tempo de irradiação por UVC. <i>Staphylococcus aureus</i> 609 <i>tet-r</i>	28
4 - Conversão fágica em <i>Staphylococcus aureus</i> PS83A.	30
5 - Eletroforese de DNA em gel de agarose. <i>Staphylococcus aureus</i>	33

1. INTRODUÇÃO

Dentre as furocumarinas, que são compostos derivados da cumarina (1,2-benzopirona), incluem-se a psoraleína, a 8-metoxipsoraleína (8MOP, xantotoxina), a 5-metoxipsoraleína (bergaptena) e a angelicina. Furocumarinas naturais têm sido isoladas principalmente de 5 famílias vegetais: Umbelíferae (*Petroselinum hortense*-salsa, *Apium graveolens*-aipo, *Ammi majus*, *Angelica archangelica*), Rutaceae (*Citrus*-bergamota, lima, limão; *Ruta graveolens*-arruda; *Xanthoxylum rhoifolium*-espinho de vintém ou maminha de cadela), Leguminosae (*Psoralea corylifolia*), Moraceae (*Ficus carica*-figo) e Orchidaceae. Além das naturais, existem também furocumarinas sintéticas, tais como a trioxsaleína (4,5', 8-trimetilpsoraleína), a 3-carbetoxipsoraleína, a 5-hidroxipsoraleína (bergaptol), a 8-hidroxipsoraleína (xantotoxol) e a 4,5'-dimetilangelicina.

Embora os orientais, há mais de 3000 anos, já conhecessem o efeito dermofotossensibilizante de certos compostos vegetais e embora a 5- e a 8-metoxipsoraleína já tivessem sido isoladas em 1834 e em 1911 respectivamente, foi somente por volta de 1940 que se estabeleceu uma re-

lação entre os componentes químicos de certas plantas e o desenvolvimento de fitofotodermatite, com evidências de que eram as furocumarinas os agentes fotossensibilizantes; na mesma época estabeleceu-se também o comprimento de ondas (320 - 400 nm) responsável pelas respostas dérmicas (*SCOTT et alii*, 1976). Enquanto os primeiros estudos com furocumarinas usavam a luz solar como fonte de irradiação, *MUSAJO et alii* em 1954 (*Apud OGINSKY et alii*, 1959) demonstraram com fonte de luz artificial a eficiência da luz ultravioleta longa (UVL) na produção de respostas dérmicas típicas de eritema e edema.

A primeira demonstração do efeito fotossensibilizante das furocumarinas em microrganismos foi dada por *FOWLKS et alii* (1958) que verificaram um aumento da susceptibilidade de diversas bactérias à UVL na presença de 13 furocumarinas (de 25 ensaiadas), especialmente da 8MOP. Desde então tem-se demonstrado que a associação furocumarina-UVL é efetiva na inativação não só de diversas espécies bacterianas como de bacteriófagos e outros vírus, actinomicetos, leveduras, fungos filamentosos (*SCOTT et alii*, 1976; *ASHWOOD-SMITH e GRANT*, 1977) e clamidomonas (*SCHIMMER e HAUBER*, 1977).

Quando se constatou que a psoraleina e a 5-metoxipsoraleina induziam mutações cromossômicas em raiz de cebola (*MUSAJO*, 1955, *Apud SCOTT et alii*, 1976), teve-se a primeira indicação do efeito mutagênico das furocumarinas. Foi no entanto *ALTENBURG* (1956, *Apud SCOTT et alii*, 1976) quem primeiro verificou a atividade mutagênica de uma furocumarina

combinada com luz ultravioleta longa, ao constatar aumento na frequência de recessivos letais ligados ao sexo em *Drosophila* após tratamento de ovos com 8MOP-UVL.

Em microrganismos no entanto, a primeira demonstração foi de *MATHEWS* (1963) que, em *Sarcina lutea*, verificou a indução de mutantes resistentes a penicilina após tratamento com 8MOP-UVL. A partir daí estudos com outros microrganismos foram relatados e, mesmo antes de suficientes e sistemáticos estudos em microrganismos celulares, o efeito mutagênico causado pela fotossensibilização de furocumarinas começou a ser esclarecido.

Com base na reversão, por mutagênicos químicos específicos, de mutações induzidas por 8MOP-UVL no bacteriófago T4, *DRAKE* e *MCGUIRRE* (1967) concluíram pela ocorrência, na maioria dos casos, de transições de bases, com transversões ocorrendo em substancial minoria.

Numa linhagem de *E. coli*, auxotrófica para triptofano, *IGALI et alii* (1970) reportaram que as mutações reversas que ocorriam após tratamento por 8MOP-UVL eram provavelmente resultantes de transições de bases e que tanto mutações supressoras como reversões verdadeiras ocorriam em frequências aproximadamente iguais. Indução de mutações, por 8MOP-UVL, com frequência relativamente alta de sobreviventes, foi relatada em *Streptomyces* (*TOWNSEND et alii*, 1971) e em *Serratia marcescens* (*JOSEPH et alii*, 1974). Em *Bacillus subtilis*, 5- e 8-hidroxipsoraleina foram também relatadas como capazes de induzirem mutações em tratamento

associado com UVL em doses que resultavam apenas ligeira, se tanto, letalidade (SONG *et alii*, 1975). Numa linhagem de *E. coli*, FUJITA e SUZUKI (1978), testando vários comprimentos de ondas, verificaram ser aquele entre 320 e 340 nm o mais eficiente para a indução de mutações em associação com a 8MOP. Em *Haemophilus influenzae* tentou-se, debalde, a indução de mutação por psoraleina-UVL, embora outros efeitos biológicos tenham ocorrido (GEORGE e NOTANI, 1980a). VENTURINI *et alii* (1981) demonstraram que a angelicina e uma série de derivados, em associação com UVL, induzem, em *Salmonella typhimurium*, mutações por substituição de bases.

Em *Aspergillus nidulans* foi evidenciado que diversos locos gênicos respondiam igualmente ao tratamento mutagênico da associação 8MOP-UVL sob condições de morte moderada (ALDERSON e SCOTT, 1970; SCOTT e ALDERSON, 1971). No referido fungo filamentoso também demonstrou-se que a 8MOP-UVL não induz aberrações cromossômicas, apenas mutações de ponto, pelo menos em linhagens diplóides (MENEZES *et alii*, 1973; BIAGI *et alii*, 1975; BIAGI, 1977).

Em *Saccharomyces cerevisiae* foi evidenciado que trioxsaleina-UVL e 8MOP-UVL são potentes indutoras de mutantes deficientes respiratórios do tipo citoplasmático em tratamentos que resultam não menos que 30% de sobreviventes (SWANBECK e THYRESSON, 1974) e que psoraleina-UVL e 8MOP-UVL são mais eficientes que angelicina-UVL na indução de mutantes nucleares mas não de mutantes citoplasmáticos (AVERBECK *et alii*, 1976) os quais são também induzidos por várias furocumarinas sintéticas associadas a UVL (AVERBECK *et alii*, 1979).

Na alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, genes nucleares e genes citoplasmáticos (mitocôndria e cloroplasto) respondem igualmente ao tratamento mutagênico da 8MOP-UVL (SCHIMMER e HAUBER, 1977; SCHIMMER, 1977).

Disso tudo depreende-se que as associações furocumarinas-UVL, especialmente 8MOP-UVL, sob condições de morte moderada, atuam primariamente como indutora de mutações de ponto, sem especificidade gênica, o que as tornam um mutagênico de utilização bastante apropriada em microrganismos industriais, conforme já relatado para *Streptomyces* (TROOST e KATZ, 1979; RHODES et alii, 1981) e fungos filamentosos (EDWARDS et alii, 1974; SIMPSON e CATEN, 1979a,b).

Além de inativação e indução de mutação, furocumarinas-UVL podem também induzir profagos em *E. coli* (FUJITA et alii, 1978; FUJITA e SUZUKI, 1978) e em *Haemophylus influenzae* (GEORGE e NOTANI, 1980a,b), e reduzir a capacidade de transferência de plasmídeo F'*lac* (COLE, 1971).

O mecanismo molecular da fotossensibilização por certas furocumarinas, como a 8MOP e a trioxsaleína, envolveria primeiramente a ligação de moléculas da furocumarina ao DNA, no escuro, formando complexos moleculares reversíveis com pirimidinas, que sob ação da luz ultravioleta longa transformar-se-iam num fotoproduto referido como *monoadduct*, alguns dos quais, sob irradiação adicional, formariam com outra pirimidina na fita oposta do DNA o fotoproduto referido como *crosslink* e a eficiência na formação dependeria das ligações químicas envolvidas inicial-

mente na formação do *monoadduct* e também da existência de uma pirimidina convenientemente localizada na fita oposta (*BRIDGES et alii*, 1979). Certas furocumarinas como a angelicina, merce de sua estrutura angular e a 3-carbetoxipsoraleína, pela disponibilidade de apenas um sítio reativo na molécula formam no DNA apenas um tipo de fotoproduto, os *monoadducts* (*AVERBECK et alii*, 1979).

Quando *IGALI et alii* (1970) evidenciaram pela primeira vez que as lesões letais e mutagênicas causadas pela 8MOP-UVL não sofriam fotorreativação mas eram sujeitas a reparo por excisão e reparo pós-replicativo, sugeriram também que letalidade e mutação poderiam ser atribuídas aos *monoadducts*, embora a existência de *crosslink* fosse para eles desconhecida (*BRIDGES et alii*, 1979). A partir daí esse problema tem sido abordado, tentando-se precisar a consequência biológica de cada tipo de fotoproduto formado no DNA após tratamento por furocumarinas-UVL (*SEKI et alii*, 1978; *BRIDGES et alii*, 1979; *KRIVISKY et alii*, 1979).

No curso do trabalho de *IGALI et alii* (1970), descobriu-se que tratamento por 8MOP-luz ultravioleta curta (UVC - 254 nm) reduzia o aparecimento de mutantes auxotróficos. Trabalhos posteriores mostraram a irrelevância da presença ou ausência de sistemas de reparo no escuro, tendo sido sugerido que a proteção contra inativação e mutagênese dever-se-ia a redução da produção de dímeros de pirimidina por parte da UVC quando a 8MOP estivesse presente (*BRIDGES*, 1971; *IGALI e GAZSÓ*, 1973).

Por muito tempo após as primeiras evidências da ação fotos

sensibilizante das furocumarinas, era geralmente aceito, e com razoáveis evidências, que as furocumarinas não tinham atividade mutagênica na ausência de luz. Realmente SCOTT (1976) não detectou tal atividade da 8MOP no escuro em linhagens de *Salmonella typhimurium* e *E. coli*; antes no entanto, CLARKE e WADE (1975) haviam reportado que 8MOP no escuro, em condições de proliferação celular, induzia, em *E. coli*, mutações com alterações no quadro de leitura (*frameshift*), o que foi posteriormente confirmado por BRIDGES e MOTTERSHEAD (1977) e inclusive para psoraleina e angelicina, mas não para trioxsaleina (ASHWOOD-SMITH, 1978). VENTURINI *et alii* (1981) demonstraram que alguns derivados da angelicina, no escuro, também induzem mutações por alteração no quadro de leitura em *S. typhimurium*. Por outro lado, a indução de mutação por UVL na ausência de agente fotossensibilizante foi demonstrado em cultura contínua de *E. coli* por KUBITSCHKE (1967), sendo que WEBB (1978) demonstrou serem as lesões mutacionais passíveis de fotorreativação.

Então, embora furocumarinas na ausência de luz, da mesma forma que a luz ultravioleta longa na ausência de substância fotossensibilizante, causem efeitos biológicos bem definidos em microrganismos, a associação furocumarina-UVL é um agente ímpar, mercê de sua ação e de seus efeitos, o que estimula investigações em outros microrganismos e/ou sobre outros possíveis efeitos genéticos.

Bacteriófagos persistem na natureza como profagos, integrados ao genoma bacteriano ou estreitamente associado ao sistema replicativo da membrana - lisogenia -, ou como infecção viral persistente, na qual o fago se multiplica numa fração da população bacteriana - pseudolisogenia -. Ocasionalmente uma célula bacteriana lisogênica pode ser liberada pela formação de um grande número de fagos maduros que são então liberados; esse é um evento raro e descontínuo mas que pode ser induzido por agentes físicos e químicos. A presença de um fago numa cultura pode ocasionar uma alteração do fenótipo bacteriano devido à expressão de genes fágicos ou à situações tais que levam à indução ou à repressão de genes bacterianos; todos esses casos podem ser referidos como conversão fágica; o termo conversão lisogênica não seria tão amplo e envolveria apenas os casos onde fica bem estabelecida a presença de um profago estável (BARKSDALE e ARDEN, 1974).

Lisogenia em *S. aureus* é virtualmente universal. Os profagos, presume-se, estão integrados no cromossoma embora ligação a um determinado locus tenha sido demonstrada somente em alguns casos (PATTEE, 1978). Profagos de *S. aureus* podem ser induzidos por luz ultravioleta curta (KARSKA et alii, 1960; NOVICK, 1963), mitomicina C (LACEY, 1971), e ácido nalidíxico (GERMAN et alii, 1971).

Pelo menos em *S. epidermidis* (PULVERER et alii, 1974), e ao que parece também em *S. aureus*, o uso de mais de uma técnica de indução é recomendável para a detecção de lisogenia, o que justifica a investigação de novos agentes indutores.

A conversão fágica em *S. aureus* pode produzir tanto perda

como aquisição de caracteres fenotípicos, quer comportamento frente a antibióticos (WAHL e FOUACE, 1961; JOLLIICK, 1972; SIQUEIRA JR. e AZEVEDO, 1978b), quer propriedades bioquímicas e toxigênicas (BARKSDALE e ARDEN, 1974; DUVAL-IFLAH *et alii*, 1977).

Assim, a atividade lipolítica que se manifesta por colônias com halo em meio de cultura com tween 80 e cloreto de cálcio (SIERRA, 1957) pode ser suprimida por certos fagos por conversão fágica (ROSENDAL e BÜLOW, 1965; BÜLOW, 1970; DUVAL-IFLAH, 1972); no entanto, a partir de linhagem lip^- , variantes lip^+ podem ser obtidas espontaneamente (ROSENDAL e BÜLOW, 1965) ou, com frequência mais alta, pelo uso da UVC ou da acriflavina (DUVAL-IFLAH, 1972) ou ainda do brometo de etídio, do metano sulfonato de etila e do cloreto de manganês (SIQUEIRA JR. e AZEVEDO, 1980), que atuariam como agentes de cura do profago.

Se isso for comprovado com outros agentes que atuam à nível de DNA, o fenômeno poderá ser melhor esclarecido e talvez o sistema possa ser usado para a detecção da potencialidade de mutagênicos e/ou carcinogênicos.

Por outro lado, durante os últimos 20 anos evidências se acumularam de que resistência a vários antibióticos, em *S. aureus* é plasmidial e transferível, pelo menos *in vitro*, por transdução e por transformação, onde é bastante claro o envolvimento de bacteriófagos (LACEY, 1975; SJÖSTRÖM e PHILIPSON, 1974). Mais recentemente evidências foram apresentadas do envolvimento de bacteriófagos na propagação, talvez até *in vivo*, de resistência plasmidial através de mecanismos não ortodoxos de transmissão do material genético (LACEY, 1980).

A primeira indicação sugestiva de herança plasmidial é usualmente a instabilidade de uma propriedade fenotípica. Por sua vez, plasmídios podem ser isolados e visualizados, por exemplo, por eletroforese em gel de agarose, e a correlação entre presença ou ausência de DNA plasmidial e presença ou ausência de um caráter fenotípico nos dá forte evidência para herança extracromossômica do referido caráter. Tentativas de isolamento de DNA plasmidial devem então ser feitas numa amostra receptora antes e depois de transferência da marca ou numa amostra original e numa sua variante que tenha perdido o caráter fenotípico.

Em *S. aureus* a frequência de eliminação espontânea de uma propriedade fenotípica pode ser aumentada pela ação de agentes físicos e químicos como temperatura elevada, 42 - 44°C (MAY *et alii*, 1964), luz ultravioleta curta (MITSUHASHI *et alii*, 1965), ondas eletromagnéticas, 2375 mHz (IGNATOV *et alii*, 1973), acriflavina e outros corantes de acridina (MITSUHASHI *et alii*, 1963; HARMON e BALDWIN, 1964), brometo de etídio (BOUANCHAUD *et alii*, 1969), rifampicina (JOHNSTON e RICHMOND, 1970), violeta de etila (RUBIN e ROSENBLUM, 1971), SDS e substâncias relacionadas (SONSTEIN e BALDWIN, 1972a,b), penicilinas (LACEY e CHOPRA, 1974), cloridrato de guanidina (COSTA *et alii*, 1980).

Apesar de resultados bastante convincentes em muitos casos, parece não existir nenhum agente que elimine qualquer plasmídio em qualquer linhagem, mesmo porque a atividade curagênica muitas vezes pode ser questionada, o que torna sempre promissora a investigação de novos agentes.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a 8-metoxipsoraleina associada à luz ultravioleta longa na indução de profagos, na cura do profago responsável pela supressão da atividade lipolítica e na cura do plasmídeo responsável pela resistência a tetraciclina, numa linhagem de *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Bactérias

As seguintes linhagens de *Staphylococcus aureus* foram utilizadas no presente trabalho:

609*tet-r* - portadora de plasmídio para resistência à tetraciclina e não produtora de lipase (*lip⁻*) pela presença de um profago que forma placas de lise grandes na PS83A (LACEY, 1971). A resistência à tetraciclina foi confirmada como plasmidial, já que induzível e não associada com resistência à minociclina (SIQUEIRA JR., não publ., conf. ASHESHOV, 1975).

PS83A - propagadora do fago 83A do Conjunto Básico Internacional (SOLE-VERNIN, 1976). Provavelmente não lisogênica, já que o filtrado obtido de cultura tratada por luz ultravioleta curta não mostrou capacidade formadora de placas de lise nas linhagens 1030 e 196E (SIQUEIRA JR., não publ.).

13136 - portadora de plasmídeo para resistência e tetraciclina (LACEY, 1972), visualizado por eletroforese em gel de agarose (COSTA *et alii*, 1980).

As linhagens 609*tet-r* e 13136 foram fornecidas pelo Dr. Richard W. Lacey (King's Lynn General Hospital, Inglaterra) e a PS83A pelo Dr. Carlos Solé-Vernin (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

2.2. Meios de cultivo

- Ágar nutriente (Blood Agar Base-DIFCO, 40 g l⁻¹).
- Ágar nutriente semi sólido (Blood Agar Base-DIFCO, 20 g l⁻¹).

Quando se trabalhava com fagos, cloreto de cálcio 0,01M era incorporado aos meios, já que muitos fagos são se adsorvem às células a eles sensíveis, quando em presença de Ca⁺⁺ (ROUNTREE, 1951).

- Ágar tween-cálcio (SIERRA, 1957 - peptona, 10 g l⁻¹; cloreto de sódio, 5 g l⁻¹; cloreto de cálcio, 0,1 g l⁻¹; ágar, 15 g l⁻¹; tween 80, 10 ml l⁻¹ autoclavado separadamente e adicionado ao meio a 45°C com vigorosa agitação; pH 7,4).

O tween 80 é um ester de ácido oleico, substrato para lipa

se produzida por linhagens de *S. aureus*. Ao redor de colônias com atividade lipolítica (lip^+), é bem visível um halo constituído de cristais de sal de cálcio do ácido graxo liberado por lipólise (Figura 1).

- Caldo infusão (Brain Heart Infusion-DIFCO, 37 g l⁻¹).

- Caldo nutriente (Nutrient Broth-DIFCO, 8 g l⁻¹; cloreto de sódio, 5 g l⁻¹; cloreto de cálcio, 0,04M).

Figura 1 - Colônias lip^- e lip^+ (halo) de *Staphylococcus aureus* em ágar tween-cálcio.

2.3. Diluentes

Cloreto de sódio 0,15M (salina).

Citrato de sódio 0,02M.

Nos experimentos de cura de profago o diluente utilizado foi o citrato de sódio o qual impede a reabsorção de fagos, prevenindo a lise de possíveis células curadas.

2.4. Drogas

As drogas mais relevantes empregadas foram:

8-Metoxipsoraleína (8MOP, SIGMA). Solução contendo $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ era preparada num dos diluentes esterilizado, após dissolução prévia em pequeno volume de acetona ($0,1 \text{ ml mg}^{-1}$).

Brometo de etídio (SIGMA). Solução estoque preparada em água destilada e autoclavada.

Tetraciclina (cloridrato de tetraciclina, ZAMBON). Solução estoque preparada em HCl 0,01N esterilizado (dissolução prévia em HCl 0,1N).

As demais drogas, quando não especificado, são de grau analítico.

2.5. Tratamento pela associação 8-metoxipsoraleína-luz ultravioleta longa (8MOP-UVL)

A partir de uma cultura bacteriana de 18 - 24 horas em caldo infusão, e por centrifugação, foi preparada uma suspensão em diluente, contendo cerca de 10^8 células ml^{-1} e $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ de 8MOP: cada volume centrifugado foi ressuspendido em três volumes do diluente e acrescido de um volume da solução de 8MOP. Após pelo menos 30 minutos no escuro à temperatura ambiente, alíquotas de 3,0 ml foram irradiadas por diversos tempos em uma placa de Petri esterilizada de 5,0 cm de diâmetro, aberta a 1,0 cm da fonte (Mineralight UV Lamp, modelo UVSL 25, regulada para emitir luz ultravioleta longa), com suave agitação em ambiente obscurecido. Alíquotas de suspensão sem 8MOP foram também irradiadas para comparação.

2.5.1. Indução de profago

Após cada tempo de irradiação, 0,1 ml da suspensão, diluída convenientemente, era misturada a 0,1 ml de uma cultura de 18-24 horas em caldo infusão da bactéria indicadora, em 2,5 ml de ágar nutriente semi sólido mantido a 45°C , o qual era vertido sobre ágar nutriente já so

lidificado; após incubação por 18 - 24 horas a 30°C era feita a contagem das placas de lise (fagos livres e bactérias induzidas a lisar). A suspensão era também semeada da mesma maneira, porém na ausência da bactéria indicadora; após incubação por 18 - 24 horas a 37°C era feita a contagem das colônias (células viáveis). Desta forma era calculada a frequência de sobreviventes e a frequência de células induzidas a liberar profagos, para cada tempo de irradiação.

2.5.2. Obtenção de variantes lip^+

Após cada tempo de irradiação, 0,1 ml de diluições convenientes da suspensão eram semeadas em ágar tween-cálcio. Após incubação por 48 horas a 37°C, pela contagem das colônias totais e das colônias lip^+ , era calculada a frequência de sobreviventes e a frequência de colônias lip^+ para cada tempo de irradiação.

2.5.3. Eliminação de resistência à tetraciclina

Após cada tempo de irradiação, 0,1 ml da suspensão diluída convenientemente era semeada e, após incubação, as colônias desenvolvidas eram transferidas por réplica (LEDERBERG e LEDERBERG, 1952) para ágar nutriente acrescido de tetraciclina (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Após incubação por

18 - 24 horas a 37°C os resultados foram anotados, calculando-se a frequência de colônias que perderam resistência à droga. As placas do experimento descrito em 2.5.2., que continham até 200 colônias foram usadas como placas mestras.

2.6. Tratamento pela luz ultravioleta curta (UVC)

Uma cultura de 18 - 24 horas em caldo infusão foi centrifugada, ressuspendida no mesmo volume de diluente e alíquotas de 3,0 ml foram irradiadas por diversos tempos em uma placa de Petri esterilizada de 5,0 cm de diâmetro, aberta a 7,0 cm da fonte (Mineralight UV Lamp, modelo UVSL 25, regulada para emitir luz ultravioleta curta), com suave agitação em ambiente obscurecido.

2.6.1. Indução de profago

Como descrito em 2.5.1.

2.6.2. Obtenção de variantes *lip⁺*

Como descrito em 2.5.2.

2.7. Tratamento pelo brometo de etídio e pela temperatura elevada

Inóculo com $10^4 - 10^5$ células ml^{-1} foi incubado a 37°C , com agitação, em frascos contendo 10 ml de caldo infusão acrescido de $4,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de brometo de etídio. Igual inóculo foi incubado a $43 - 44^\circ\text{C}$ em caldo infusão, sem agitação. Como controle, igual inóculo foi incubado em caldo infusão sem brometo de etídio a 37°C . Em todos os casos, após 18 - 24 horas a suspensão foi diluída convenientemente e semeada em ágar nutriente; após incubação por 18 - 24 horas a 37°C as colônias desenvolvidas foram transferidas por réplicas (LEDERBERG e LEIDERBERG, 1952) para ágar nutriente acrescido de tetraciclina ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$); após incubação por 18 - 24 horas a 37°C era possível calcular a frequência de colônias que perderam resistência à droga.

2.8. Obtenção de lisado

Uma cultura de 18 - 24 horas em caldo infusão foi centrifugada, ressuspensa em salina e irradiada com luz ultravioleta curta por 20 segundos como descrito em 2.6. Um volume de caldo infusão 10 X concentrado foi adicionado a 9 volumes da suspensão irradiada e a mistura incubada a 37°C com agitação por duas horas e, ato contínuo, por mais duas horas a 30°C sem agitação, quando então foi filtrada duas vezes em membrana de $0,45 \mu$ de porosidade (Wild Leitz, modelo BA85/21) e guardada em geladeira sem preservativo.

Para se confirmar a presença de fagos num lisado ou para se verificar se uma bactéria era resistente ou sensível a um determinado lisado, a bactéria era semeada com zaragatoa embebida da suspensão e gotas do lisado eram a seguir depositadas; após incubação por 18-24 horas a 30°C era verificada a ocorrência de lise na área correspondente a deposição do lisado.

2.9. Conversão fágica

Um ml do lisado foi misturado a 0,1 ml de uma cultura de 18 - 24 horas em caldo infusão da bactéria *lip*⁺, em 10 ml de caldo nutritivo. Após incubação por 3 dias a 30°C foram feitas semeaduras por esgotamento de alça em ágar tween-cálcio e posterior incubação por 48 horas a 37°C para se detectar possíveis colônias de células *lip*⁻.

2.10. Fagotipagem

A fagotipagem foi realizada no Laboratório de Fagotipagem de *Staphylococcus aureus* (Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo) pela equipe do Dr. Carlos Solé-Vernin, membro da Sub-Comissão Internacional de Fagotipagem de *Staphylococcus aureus*, da Associação In-

ternacional das Sociedades Nacionais de Microbiologia.

Foram empregados os seguintes fagos: 29, 52, 52A, 79, 80, 3A, 3C, 55, 71, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85, 81, 94, 95, 96 (Conjunto Básico Internacional); 86, 88, 89, 90, 92, D11, HK2 (Conjunto Experimental); 187 (Conjunto Extra); a 1 X RTD e a 100 X RTD (*SOLÉ-VERNIN, 1976*).

2.11. Eletroforese de DNA em gel de agarose (*D.S. SANTOS, não publ., apud BASTOS e PENIDO, 1981*)

Um ml de uma cultura de 18 - 24 horas em caldo infusão foi centrifugada, ressuspensa em mesmo volume de tampão TEB (tris 89mM; EDTA 2,5mM; H_3BO_3 89mM; pH 8,2), novamente centrifugada e ressuspensa em sacarose 20%. À 10 μ l da suspensão em sacarose, já colocada numa canaleta da placa de gel (agarose SEAKEN tipo ME, 0,8%), adicionou-se 30 μ l da mistura lítica (lisostafina SIGMA 500 μ l ml^{-1} ; RNase 2,0 μ l ml^{-1} ; ficoll PHARMACIA 20% e azul de bromofenol 0,025%); a seguir foram acrescentados 30 μ l de uma mistura constituída de ficoll 10% e SDS 0,2% e 100 μ l de outra constituída de ficoll 5% e SDS 0,2%. Todas as soluções e misturas, bem como o gel foram preparadas em tampão TEB.

A eletroforese foi realizada em câmara vertical a 2mA durante 45 minutos e, ato contínuo, a 45 mA por 90 minutos. A coloração foi feita com brometo de etídio (0,4 μ g ml^{-1} em tampão TEB) e as bandas visualizadas com auxílio de luz ultravioleta curta e fotografadas através de filtro laranja (Asahi Pentax 02).

3. RESULTADOS

3.1. Efeitos da 8MOP-UVL

Em todos os experimentos realizados, para cada tempo de irradiação, na presença e na ausência de 8MOP, foi calculada a sobrevivência ($\text{título bacteriano no tempo } t \times 100 / \text{título bacteriano no tempo } 0$). Os resultados (médias de pelo menos 6 experimentos) estão na Tabela 1 e Figura 3.

O efeito da 8MOP-UVL na indução de profagos foi verificada na linhagem 609*tet-r*, utilizando-se como indicadora a PS83A. Mais de um tipo de placa de lise foram observadas (Figura 2). A frequência de indução ($\text{título fágico no tempo } t \times 100 / \text{título bacteriano no tempo } 0$), após cada tempo de irradiação, na presença e na ausência de 8MOP, estão apresentadas na Tabela 2 e Figura 3 (médias de pelo menos 3 experimentos).

Tabela 1 - Sobrevivência da linhagem 609*tet-r* de *Staphylococcus aureus* após irradiação por UVL na presença e na ausência de 8MOP.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (SEG.)	PORCENTAGEM DE SOBREVIVENTES	
	NA PRESENÇA DE 8MOP	NA AUSÊNCIA DE 8MOP
0	100	100
20	70	82
40	11	85
60	0,28	90
80	0,0012	82

Tabela 2 - Indução de profagos na linhagem 609*tet-r* de *Staphylococcus aureus*, após irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (SEG.)	PORCENTAGEM DE CÉLULAS INDUZIDAS A LISAR	
	NA PRESENÇA DE 8MOP	NA AUSÊNCIA DE 8MOP
0	0,084	0,039
20	0,72	0,032
40	10	0,10
60	2,6	0,13
80	0,19	0,11

Figura 2 - Diferentes placas de lise causadas por fagos isolados da linhagem 609tet-r de *Staphylococcus aureus* sobre a indicadora PS83A. (aumento 1X).

O efeito da 8MOP na possível cura do profago responsável pelo caráter *lip*⁻ foi verificada também na linhagem 609*tet-r*. A Tabela 3 mostra a frequência de aparecimento de variantes *lip*⁺ após cada tempo de irradiação na presença e na ausência de 8MOP (médias de pelo menos 3 experimentos). Para posterior estudo foram isoladas as variantes 609V1, 609V3, 609V4 e 609V5.

Tabela 3 - Obtenção de variantes *lip*⁺ a partir da linhagem 609*tet-r* de *Staphylococcus aureus*, após irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (SEG.)	PORCENTAGEM DE VARIANTES <i>lip</i> ⁺	
	NA PRESENÇA DE 8MOP	NA AUSÊNCIA DE 8MOP
0	0,02	0,019
20	0,17	0,011
40	0,53	0,024
60	0,45	0,016
80	0,44	0,037

A amostra 609*tet-r* foi ainda utilizada para se verificar o efeito da 8MOP-UVL na possível cura de um plasmídeo para resistência a tetraciclina. A frequência de eliminação de resistência, após cada tempo de irradiação, na presença e na ausência de 8MOP, estão apresentadas na Tabela 4 (valores extremos de pelo menos 3 experimentos). Para posterior estudo foram isoladas algumas variantes sensíveis.

Tabela 4 - Eliminação de resistência à tetraciclina na linhagem 609*tet-r* de *Staphylococcus aureus* após irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (SEG.)	PORCENTAGEM DE VARIANTES SENSÍVEIS	
	NA PRESENÇA DE 8MOP	NA AUSÊNCIA DE 8MOP
0	0,00 - 0,17	0,00 - 0,12
20	0,29 - 1,25	0,00 - 0,65
40	0,14 - 0,75	0,00
60	0,67 - 1,50	0,00
80	0,61 - 1,70	0,00 - 0,41

3.2. Efeitos da UVC

Para comparação foi verificado o efeito da luz ultravioleta curta na indução de profagos e na possível cura do profago responsável pelo caráter *lip⁻* na linhagem 609*tet-r*. Os resultados, bem como as frequências de sobrevivência, estão na Tabela 5 e Figura 3 (médias de pelo menos 3 experimentos).

Tabela 5 - Sobrevivência, indução de profagos e obtenção de variantes *lip*⁺ na linhagem 609*tet-r* de *Staphylococcus aureus*, após irradiação por UVC.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (SEG.)	F R E Q U Ê N C I A S (%)		
	SOBREVIVÊNCIA	INDUÇÃO	VARIANTES <i>lip</i> ⁺
0	100	0,19	-
5	68	2,6	-
10	36	4,5	-
20	6,3	4,7	-
30	1,1	3,6	0,69
40	0,034	-	0,54

Figura 3 - Sobrevivência e indução de profagos em função do tempo de irradiação por UVL, na presença e na ausência de 8MOP, e em função do tempo de irradiação por UVC. *Staphylococcus aureus* 609^{tet-r}.

3.3. Efeitos do brometo de etídio e da temperatura elevada

Também para comparação foram verificados os efeitos do brometo de etídio e da temperatura elevada na eliminação de resistência a tetraciclina na amostra 609*tet-r*.

No primeiro caso, em 4 experimentos realizados, não foram obtidas variantes sensíveis; no segundo caso, também de 4 experimentos realizados, em apenas um se isolou variantes sensíveis, com uma frequência de 0,12%. Para todos os controles, a frequência de variantes sensíveis foi 0,00%.

3.4. Conversão fágica

Das variantes *lip*⁺ isoladas (item 3.1.), bem como da linhagem original 609*tet-r*, foram obtidos lisados com os quais tentou-se conversão fágica na PS83A (*lip*⁺ → *lip*⁻).

Apesar de todos os lisados conterem profagos ativos contra a PS83A, apenas com o da linhagem original (L609) observou-se conversão (Figura 4), tendo sido isoladas, para posterior estudo as variantes convertidas PS83A(L609)A, PS83A(L609)B e PS83A(L609)C.

Figura 4 - Conversão fágica em *Staphylococcus aureus* PS83A.

ESQUERDA: após incubação da PS83A (lip^+) por 3 dias em caldo nutriente com o lisado L609 e posterior semeadura em ágar tween-cálcio, colônias lip^- são detectadas.

DIREITA: com lisado obtido de variantes lip^+ , colônias lip^- não são detectadas.

3.5. Fagotipagem

A linhagem 609*tet-r* (*lip*⁻) e suas variantes *lip*⁺ isoladas após tratamento por 8MOP-UVL, bem como a PS83A (*lip*⁺) e suas variantes convertidas *lip*⁻ (item 3.4.), foram submetidas à fagotipagem.

A Tabela 6 mostra a reatividade total das amostras bacterianas frente aos fagos a 100 X RTD.

3.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Com a linhagem 609*tet-r* e com suas variantes sensíveis a tetraciclina, isoladas após tratamento por 8MOP-UVL (item 3.1.), foi feita eletroforese de DNA em gel de agarose. Como referência empregou-se a linhagem 13136, portadora de plasmídeo para resistência à tetraciclina, com peso molecular de $2,9 \times 10^6$ daltons (LACEY e GRINSTED, 1973).

O resultado pode ser visualizado na Figura 5.

Tabela 6 - Reatividade de amostras de *Staphylococcus aureus* frente a fagos tipadores a 100 X RTD.

FAGOS	B A C T É R I A S								
	609 ^{tet-r}	609V1	609V3	609V4	609V5	PS83A	PS83A(L609)A	PS83A(L609)B	PS83A(L609)C
29	++	++	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	+	-	-	-
52A	-	-	-	-	-	+	+	-	-
79	-	-	-	-	-	+	-	-	-
80	++	-	-	-	-	-	-	-	-
3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	+	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	+	-	++	-	-	-
6	++	++	++	++	++	++	++	-	-
42E	-	-	+-	-	-	++	++	-	-
47	++	++	-	++	++	++	++	-	-
53	-	-	+-	++	+	++	++	-	+-
54	++	++	++	++	++	++	+-	-	+-
75	++	++	++	++	++	+	-	-	-
77	++	++	+	++	++	++	++	-	-
83A	-	+-	+	+	+	++	+-	-	-
84	-	+-	+	++	++	++	++	0(-)	0(+)
85	++	+	+	++	++	++	++	-	-
94	-	-	-	+-	-	-	-	-	-
95	+-	-	-	-	-	++	-	-	+-
96	-	-	-	+-	-	+-	-	-	-
86	+-	-	+-	++	+-	++	++	0(+)	0(+)
88	++	+-	+-	++	++	++	++	-	-
89	++	++	++	++	++	++	++	-	-
90	++	-	+	++	++	++	++	-	-
92	++	++	++	++	++	++	++	-	-
D11	+-	+-	+-	+-	+-	++	+-	-	-
HK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
187	-	-	-	-	-	-	-	-	-

++ : > 50 placas de lise

+ : 21 - 50 placas de lise

+- : 1 - 20 placas de lise

- : não reage

0 : reação de inibição; entre parênteses a reação a 1 X RTD

Figura 5 - Eletroforese de DNA em gel de agarose.
Staphylococcus aureus.

A: linhagem 13136.

B: linhagem 609*tet-r*.

SETA: plasmídeo para resistência a tetraciclina (PM $2,9 \times 10^6$ daltons).

C, D e E: variantes sensíveis à tetraciclina isoladas da linhagem 609*tet-r* após tratamento por 8MOP-UVL (ausência da banda correspondente ao plasmídeo para resistência à tetraciclina).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Da indução de profagos

As frequências de indução de profagos após irradiação por UVL, na presença de 8MOP, quando lançadas em gráfico em função da dose, revelam uma curva de dose-efeito típica, de há muito conhecida para outros sistemas lisogênicos (*JACOB e WOLLMAN, 1959; KONDO et alii, 1970*), inclusive aquele do *S. epidermidis* (*CALDAS, 1963*), sob ação de agentes físicos e químicos.

Assim, a partir de uma frequência inicial, reflexo inclusive do número de fagos livres na suspensão, a frequência de bactérias que são induzidas a liberar fagos começa a se elevar com o aumento da dose, passa por um máximo, que varia de acordo com o sistema lisogênico em estudo, e decresce exponencialmente, mesmo porque decresce também a sobrevivência. No presente trabalho a frequência máxima de indução foi de 10% para uma sobrevivência de 11%.

A UVL, na ausência de 8MOP, é bem menos eficiente na indução de profagos, pelo menos nas doses empregadas. A 8MOP na ausência de irradiação, parece não exercer influência na indução, como se pode inferir a partir das frequências no tempo 0; outras concentrações dessa furcumarina devem no entanto ser ensaiadas para conclusões mais definitivas.

Observando-se a Figura 3, verifica-se que para as mais altas sobrevivências (> 36%) a UVC é mais eficiente que 8MOP-UVL para a indução de profagos mas, no entanto, a situação é inversa ao se considerar a frequência máxima de indução.

Também após tratamento por 8MOP-UVL, curva semelhante a aqui obtida o foi por *FUJITA et alii* (1978) em *E. coli* (λ) com uma frequência máxima de indução de 27% para uma sobrevivência de 60%. *FUJITA e SUZUKI* (1978), ensaiando vários comprimentos de ondas, desde 298 até 380 nm, determinaram ser aquele entre 320 e 345 nm o mais eficiente para este efeito biológico, com frequências máximas de indução entre 10 e 20%.

Em *H. influenzae* profago pode também ser induzido por psoralena-UVL em linhagem selvagem, em linhagem deficiente em reparo por excisão (*uvr1*, *uvr2*) mas não numa linhagem deficiente em recombinação (*rec-1*); no entanto, eventos recombinacionais *per se* podem não estar envolvidos na indução de profagos nessa bactéria já que ocorre normalmente em linhagem *rec-2* (*GEORGE e NOTANI, 1980b*). Estudos semelhantes poderiam ser feitos em *S. aureus* mercê da existência de linhagens *rec⁻* (*WYMAN et*

alii, 1974), da existência de metodologia para isolamento de linhagens *uvr* (GOERING, 1979) e da relativa facilidade em se construir linhagens lisogênicas (LACEY, 1980). O emprego de tais linhagens seria de importância para melhor elucidar o mecanismo de ação de furocumarinas-UVL não só na indução de profagos mas também em outros efeitos biológicos.

4.2. Da cura de profagos

Preliminarmente tinha-se verificado que a partir de linhagens lip^- de *S. aureus*, variantes lip^+ poderiam ser obtidas, com frequência maior que espontaneamente, após tratamento por 8MOP-UVL. As frequências obtidas foram de 0,68% (0,036% de sobrevivência) na linhagem PS85 (SIQUEIRA JR. e AZEVEDO, 1980) e de 0,44% (0,083% de sobrevivência) na linhagem PS54 (SIQUEIRA JR., não publ.).

No presente trabalho, com a linhagem 609*tet-r* previamente tratada com 8MOP, foram ensaiadas doses crescentes de UVL e foi verificado que a ocorrência de variantes lip^+ aumenta com a dose até o tempo de 40 segundos de irradiação (0,53% de variantes lip^+ , 11% de sobrevivência) quando então praticamente se estabiliza, ao mesmo tempo que a sobrevivência continua a decrescer.

Irradiação na ausência de 8MOP, bem como a referida furocumarina na ausência de irradiação, não aumentam a frequência de aparecimento

to de variantes lip^+ , pelo menos nas doses de UVL e na concentração de 8MOP empregada.

Para certas doses, tratamento por 8MOP-UVL é tão eficiente quanto a UVC.

DUVAL-IFLAH (1972), a partir da linhagem PS54 e após tratamento por UVC e por acriflavina, observou a ocorrência de variantes lip^+ numa frequência de até 0,5% para ambos os tratamentos, com frequência espontânea variando de 0,01 a 0,1%.

Em trabalho anterior (SIQUEIRA JR. e AZEVEDO, 1980), foram também ensaiados alguns agentes químicos e os resultados são mostrados na Tabela 7. Não só pelo uso de linhagem diferentes mas também pelo caráter preliminar do trabalho, seria temerário uma comparação em termos de eficiência mas, de qualquer forma, os dados são coerentes com os aqui agora obtidos.

Tabela 7 - Obtenção de variantes lip^+ a partir de linhagem lip^- de *Staphylococcus aureus* (PS85), após tratamento por agentes químicos (SIQUEIRA JR. e AZEVEDO, 1980).

TRATAMENTO	VARIANTES lip^+ (%)
Brometo de etídio	0,44
Metano sulfonato de etila 4%	1,04
Metano sulfonato de etila 16%	1,71
Cloreto de manganês	0,15
Controle	0,055

O fagótipo apresentado por uma linhagem de *S. aureus* pode ser considerado como reflexo dos profagos que ela contém (*OSHIMA et alii*, 1967), embora hoje se saiba que depende também de restrição e modificação (*STOBBERINGH e WINKLER*, 1977). Pela Tabela 6 observa-se que as variantes lip^+ isoladas apresentam reatividade aos fagos diferentes a da linhagem original 609*tet-r* e isso seria indicativo da cura do profago responsável pelo caráter lip^- . No entanto, contrariando as expectativas, já que *DUVAL-IFLAH* (1972) verificou que variantes lip^+ eram susceptíveis ao lisado obtido da linhagem original PS54, foi aqui verificado que o lisado L609 não mostrava capacidade formadora de placas de lise nas variantes lip^+ , exceto na 609V4.

Tentou-se então conversão do fenótipo lip^+ para lip^- na PS83A, com lisados obtidos das variantes 609V1, 609V3, 609V4 e 609V5. A não ocorrência da conversão indica de maneira mais clara que, realmente as variantes lip^+ foram curadas do profago responsável pelo caráter lip^- , embora, já que nem sempre susceptíveis ao lisado L609, possam continuar portadores de outro(s) profago(s) relacionado(s) mas não conversor(es).

Como controle, tentou-se, com sucesso, conversão com o lisado L609. As variantes convertidas PS83A(L609)A, PS83A(L609)B e PS83A(L609)C, se mostraram resistentes ao referido lisado e apresentaram uma redução na susceptibilidade a diferentes fagos (Tabela 6), e isso é coerente com a ocorrência de lisogenização da PS83A. Para futuras investigações, estas variantes convertidas seriam mais apropriadas já que por-

tadoras, ao que tudo indica, de apenas um profago, aquele responsável pelo fenótipo *lip*⁻.

Mas, de qualquer maneira, já aqui fica detectado mais um efeito biológico da 8MOP-UVL em bactéria - cura de profago - o que poderá ser útil em futuras investigações tanto sobre a ação de furocumarinas-UVL em bactérias, como sobre os mecanismos que se operam quando da cura de profagos.

4.3. Da cura de plasmídio

A resistência a altas concentrações de tetraciclina em *S. aureus* pode ser constitutiva, associada com resistência à minociclina e cromossômica ou, induzível, não associada com resistência à minociclina e plasmidial (ASHESHOV, 1975).

Da mesma forma que outras marcas plasmidiais, a resistência induzível à tetraciclina é passível de eliminação por diversos agentes físicos ou químicos, embora em alguns casos ela se mostre excepcionalmente estável, como em linhagens resistentes também a metecilina (LACEY e GRINSTED, 1973). Na Tabela 8 são mostrados os resultados obtidos com diversos tratamentos.

Tabela 8 - Eliminação de resistência à tetraciclina em *Staphylococcus aureus*.

TRATAMENTO	LINHAGEM	% DE ELIMINAÇÃO	REFERÊNCIA
TE	várias (5)	0,4 - 9,3	ASHESHOV, 1966
	várias (24)	0,0	
	E169	54,6	GRUBB e O'REILLY, 1971
	609tet-r	0,044	LACEY, 1971
	E169	46,0	GRUBB et alii, 1972
	várias*	0,0	LACEY e GRINSTED, 1973
	1073**	9,0 - 16,0	
	649	0,0	LACEY e CHOPRA, 1974
	720	0,5	STIFFLER et alii, 1974
	720a	82,0	
	1809	0,01	ASHESHOV, 1975
	3107	0,06	
	2292	0,0	BASTOS, 1979
	A-443	0,59 - 1,77	
UVC	E169	5,0	MAY et alii, 1964
OEM	33	16,2 - 77,8	IGNATOV et alii, 1973
	1074	0,0 - 53,0	
AF	E169	6,0	MAY et alii, 1964
	E169	0,0	GRUBB e O'REILLY, 1971
BE	E169	4,8	GRUBB e O'REILLY, 1971
	várias (4)***	0,41 - 3,17	SIQUEIRA JR. e AZEVEDO, 1978a
	várias (8)	0,0	
GuHCl	3A45***	21,8 - 51,9	COSTA, 1978

TE = temperatura elevada; UVC = luz ultravioleta curta; OEM = ondas eletromagnéticas; AF = acriflavina; BE = brometo de etídio; GuHCl = cloridrato de guanidina.

*8 linhagens resistentes a metecilina.

**sensível a metecilina.

***linhagem 3A45 após tratamento por BE: 0,41% de eliminação.

Divergências entre os resultados obtidos numa mesma amostra podem ser atribuídas a diferentes modos de ação dos agentes. A eliminação de resistência parece ser um fenômeno errático e as condições experimentais bem como a linhagem em estudo e o próprio plasmídeo podem ser críticos (*LACEY, 1975*), sendo então compreensível as diferenças quantitativas observadas para um mesmo agente.

ASHESHOV (1966) e *GRUBB et alii (1972)* obtiveram eliminação de resistência a tetraciclina quer em linhagens doadoras, quer em transductantes; *LACEY e GRINSTED (1973)*, por outro lado, não conseguiram eliminação nem mesmo quando a resistência foi transferida por transdução para outra linhagem. Pelo menos com relação a temperatura elevada, parece que a estabilidade (ou instabilidade) dessa marca de resistência é propriedade do plasmídeo e não da bactéria que o contém.

Na linhagem 609*tet-r*, *LACEY (1971)* obteve eliminação de resistência à tetraciclina numa frequência de 0,044%. No presente trabalho, com o brometo de etídio variantes sensíveis não foram obtidas e com temperatura elevada o foram em apenas um experimento numa frequência de 0,12%.

Após tratamento com 8MOP-UVL, variantes sensíveis foram obtidas com frequência de até 1,7%. No entanto, os resultados foram erráticos não se detectando efeito de dosagem.

Os resultados referentes a irradiação na ausência de 8MOP foram também erráticos, não havendo, todavia, evidências da ação da UVL na eliminação da resistência, pelo menos nas doses empregadas. Da mesma

forma e pelo menos com a concentração utilizada, a 8MOP parece não exercer nenhuma influência sobre o caráter.

O resultado obtido com a eletroforese em gel de agarose foi bastante claro. Concomitante ao desaparecimento do caráter fenotípico após tratamento por 8MOP-UVL, houve também desaparecimento de uma banda que pôde ser identificada como relativa ao plasmídio portador do gene para resistência à tetraciclina. Assim, a associação 8MOP-UVL poderia ser considerada como um novo agente capaz de eliminar plasmídios em *S. aureus*.

HAHN e CIAK (1971) propuseram a hipótese de que substâncias que se ligam ao DNA por intercalação eliminam plasmídios, por terem sua conformação molecular alterada, embora substâncias desnaturantes de proteínas e que atuam a nível de membrana biológica, também o façam, talvez devido a ruptura do sítio de manutenção do plasmídio na membrana (SONSTEIN e BALDWIN, 1972a,b; COSTA et alii, 1980).

YOAKUM e COLE (1978) evidenciaram um paralelismo entre a ação de agentes intercalantes (brometo de etídio e proflavina) e de furocumarinas-UVL em DNA e mostraram que fotorreação da trioxsaleína com DNA de plasmídio *ColE1* e *ColE1amp*, resulta em alteração (atraso) da mobilidade em gel de agarose, talvez como consequência de alteração da conformação molecular. Por outro lado, BENSASSON et alii (1978), apresentaram evidências de que significantes danos, como ao DNA, podem ser causados às proteínas por furocumarinas-UVL; em conexão, MEFFERT (1977, apud VERONESE et alii, 1979) evidenciou a localização de 8MOP na membrana de células cu

tâneas e *FREDERIKSEN e HEARST*, (1979) sugeriram que a 4'-aminometil trioxsaleína pode se ligar a proteínas ou a lipídeos na membrana dos lisossomos causando sua ruptura.

Embora essas investigações tenham se valido de métodos físico-químicos, sem correlacionar os resultados a dados genéticos, ou ainda tenham se valido de sistemas biológicos que não microrganismos, elas fornecem razoáveis bases para especulações. No entanto, ulteriores estudos são necessários onde os eventos moleculares possam ser bem caracterizados.

5. LITERATURA CITADA

- ALDERSON, T. e B.R. SCOTT, 1970. The photosensitising effect of 8-metoxypsoralen on the inactivation and mutation of *Aspergillus* conidia by near ultra violet light. *Mutation Research*, 9:569-578.
- ASHESHOV, E.H., 1966. Loss of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* resulting from growth at high temperature. *Journal of General Microbiology*, 42:403-410.
- ASHESHOV, E.H., 1975. The genetic of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, 88:132-140.
- ASHWOOD-SMITH, M.J., 1978. Frameshift mutations in bacteria produced in the dark by several furocumarins; absence of activity of 4,5',8-trimethylpsoralen. *Mutation Research*, 58:23-27.

- ASHWOOD-SMITH, M.J. e E. GRANT, 1977. Conversion of psoralen DNA monoadducts in *E. coli* to interstrand DNA cross links by near UV light (320 - 360 nm): Inability of angelicin to form cross links, *in vivo*. *Experientia*, 33:384-386.
- AVERBECK, D., E. BISAGNI, J.P. MARQUET, P. VIGNY e F. GABORIAU, 1979. Photobiological activity in yeast of derivatives of psoralen substituted at the 3,4 and/or 4',5' reaction site. *Photochemistry and Photobiology*, 30:547-555.
- AVERBECK, D., R.K. BISWAS e P. CHANDRA, 1976. Photoinduced mutations by psoralens in yeast cells. In: E. JUNG (ed.). Proceedings of the German-Swedish Symposion on Photomedicine in Oberursel/W. Germany (april, 1975), F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, p.97-104.
- BARKSDALE, L. e S.B. ARDEN, 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeni, and phage conversions. *Annual Review of Microbiology*, 28:265-299.
- BASTOS, M.C.F., 1979. Transdução de genes de resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 126p. (Tese de Mestrado).

- BASTOS, M.C.F. e E.G.C. PENIDO, 1981. Transduction in *Staphylococcus aureus*: selection of donors and recipient strains for drug resistance genes. *Revista Brasileira de Genética*, 4:41-53.
- BENSASSON, R.V., E.J. LAND e C. SALET, 1978. Triplet excited state of furocoumarins: reaction with nucleic acid bases and amino acids. *Photochemical and Photobiology*, 27:273-280.
- BIAGI, C.M.R., 1977. Mutantes morfológicos induzidos por 8-metoxipsoraleína e luz ultra-violeta em *Aspergillus nidulans*. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 150p. (Dissertação de Mestrado).
- BIAGI, C.M.R., E.M. MENEZES e J.L. AZEVEDO, 1975. Mutagenicidade de 8-MOP em *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Cultura*, 27 (supl.):228.
- BOUANCHAUD, D.H., M.R. SCAVIZZI e Y.A. CHABBERT, 1969. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. *Journal of General Microbiology*, 54:417-425.
- BRIDGES, B.A., 1971. Genetic damage induced by 254 nm ultraviolet light in *Escherichia coli*. 8-Methoxypsoralen as protective agent and repair inhibitor. *Photochemistry and Photobiology*, 14:659-662.

- BRIDGES, B.A. e R.P. MOTTERSHEAD, 1977. Frameshift mutagenesis in bacteria by 8-methoxypsoralen (methoxalen) in the dark. *Mutation Research*, 44:305-312.
- BRIDGES, B.A., R.P. MOTTERSHEAD e A. KNOWLES, 1979. Mutation induction and killing of *Escherichia coli* by DNA adducts and crosslinks: a photobiological study with 8-methoxypsoralen. *Chemico-Biological Interaction*, 27:221-233.
- BÜLOW, P., 1970. A new epidemic phage pype of *Staphylococcus aureus*.
5. Epidemic spread of phages among Danish hospital staphylococci. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 78:29-40.
- CALDAS, L.R., 1963. Estudo radiobiológico do sistema lisogênico do *Staphylococcus albus*. Aspectos da replicação viral; efeitos da estreptomicina. Universidade do Brasil. Rio de Janeiro. 56p. (Tese de Livre-Docência).
- CLARKE, C.H. e M.J. WADE, 1975. Evidence that caffeine, 8-methoxypsoralen, and steroidal diamines are frameshift mutagens for *E. coli* K-12. *Mutation Research*, 28:123-125.
- COLE, R.S., 1971. Inactivation of *Escherichia coli*, F'episomes at transfer, and bacteriophage lambda by psoralen plus 360 nm light: significance of deoxyribonucleic acid cross-links. *Journal of Bacteriology*, 107:843-852.

- COSTA, M.L.P., 1978. Eliminação da resistência extracromossômica a drogas em *Staphylococcus aureus*, pela ação do cloridrato de guanidina. Universidade de São Paulo. São Paulo. 64p. (Dissertação de Mestrado).
- COSTA, M.L.P., E. PENIDO e S.O.P. COSTA, 1980. Loss of extrachromosomal resistance in *Staphylococcus aureus* by treatment with guanidine hydrochloride. *Journal of General Microbiology*, 118:543-548.
- DRAKE, J.W. e J. MCGUIRRE, 1967. Properties of r mutants of bacteriophage T4 photodynamically induced in the presence of thiopyronin and psoralen. *Journal of Virology*, 1:260-267.
- DUVAL-IFLAH, Y., 1972. Lysogenic conversion of the lipase in *Staphylococcus pyogenes* group III strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 18:1491-1497.
- DUVAL-IFLAH, Y., J. HEIJENOORT, M. ROUSSEAU e P. RAIBAUD, 1977. Lysogenic conversion for multiple characters in a strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 130:1281-1291.
- EDWARDS, G.F. ST. L., G. HOLT e K.D. MACDONALD, 1974. Mutants of *Aspergillus nidulans* impaired in penicillin biosynthesis. *Journal of General Microbiology*, 84:420-422.

FOWLKS, W.L., D.G. GRIFFITH e E.L. OGINSKY, 1958. Photosensitization of bacteria by furocoumarins and related compounds. *Nature*, 181:571-572.

FREDERIKSEN, S. e J.E. HEARST, 1979. Binding of 4'-aminomethyl 4,5', 8-trimethylpsoralen to DNA, RNA and protein in *HeLa* cells and *Drosophila* cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 563:343-355.

FUJITA, H. e K. SUZUKI, 1978. Effect of near-UV light on *Escherichia coli* in the presence of 8-methoxypsoralen: wavelenght dependency of killing, induction of prophage, and mutation. *Journal of Bacteriology*, 135:345-362.

FUJITA, H., M. SANO e K. SUZUKI, 1978. Effect of near ultraviolet light on *Escherichia coli* sensitized with 8-methoxypsoralen: mutagenic effect and induction of lambda prophage. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 3:35-42.

GEORGE, M. e N.K. NOTANI, 1980a. Induction of prophage & absence of mutation induction by psoralen plus near UV light exposure in *Haemophilus influenzae*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 18:580-582.

- GEORGE, M. e N.K. NOTANI, 1980b. Genetic control of prophage induction in *Haemophilus influenzae* after exposure to psoralen plus near-UV light. *Journal of Virology*, 35:965-967.
- GERMAN, A., J. PANOUSE-PERRIN e A.C. ARDOUIN, 1971. Étude comparative de l'action de la mitomycine C et de celle de l'acide nalidixique sur des staphylocoques normaux et lysogènes. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 29:93-106.
- GOERING, R.V., 1979. Mutants of *Staphylococcus aureus* deficient in recombination repair. *Mutation Research*, 60:279-289.
- GRUBB, W.B. e J.R. O'REILLY, 1971. Joint transduction of separate extrachromosomal drug resistance determinants in *Staphylococcus aureus* E169. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 42:377-383.
- GRUBB, W.B., R.J. O'REILLY e J.W. MAY, 1972. Segregation of co-transduced streptomycin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Genetical Research*, 20:43-50.
- HAHN, F.E. e J. CIAK, 1971. Elimination of bacterial episomes by DNA-complexing compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 182:295-304.

- HARMON, S.A. e J.N. BALDWIN, 1964. Nature of the determinant controlling penicillinase production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 87:593-597.
- IGALI, S. e L.G. GAZSÓ, 1973. Protective effect of 8-methoxypsoralen on the lethal and mutagenic action of ultraviolet irradiation at 254 nm in *Escherichia coli* strains with different repair capacities. *Mutation Research*, 21:37.
- IGALI, S., B.A. BRIDGES, M.J. ASHWOOD-SMITH e B.R. SCOTT, 1970. Mutagenesis in *Escherichia coli* IV. Photosensitization to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. *Mutation Research*, 9:21-30.
- IGNATOV, V.V., B.A. SHENDEROV, V.I. PANASENKO, A.P. PIDENKO e A.N. MAGAGINA, 1973. The elimination of genetic determinants of resistance in *Staphylococcus aureus* during the action of strong electromagnetic field on the cells. *Soviet Genetics*, 9:447-450.
- JACOB, F. e E.L. WOLLMAN, 1959. Lysogeny. In: Burnet, F.M. e W.M. Stanley (ed.). *The Viruses*. Academic Press. Londres. p.319-351.
- JOHNSTON, L.H. e M.R. RICHMOND, 1970. The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. *Journal of General Microbiology*, 60:137-139.

- JOLLIICK, J.D., 1972. Evidence for bacteriophage conversion in *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 6:97-100.
- JOSEPH, R., M.S. SHANTHAMMA, F. REHANA e K. NAND, 1974. Induced mutations in *Serratia marcescens* by near UV-light in presence of psoralen. *Experientia*, 30:360-361.
- KARSKA, B., W. KOZAK, B. NARBUTOWICZ e A. STOLARSKA, 1960. The lysogenicity of staphylococci isolated in Poland. *Journal of General Microbiology*, 23:577-581.
- KONDO, S., H. ICHIKAWA, K. IWO e T. KATO, 1970. Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of *Escherichia coli* with different DNA repair capacities. *Genetics*, 66:187-217.
- KRIVISKY, A.S., V.V. ESIPOVA e A.V. ZUEV., 1979. Induction of mutations and repair in bacteriophages after photosensitizing action of 8-methoxypsoralen. *Biologisches Zentralblatt*, 98:175-183.
- KUBITSCHKEK, H.E., 1967. Mutagenesis by near-visible light. *Science*, 155:1545-1546.
- LACEY, R.W., 1971. Transfer of tetracycline resistance between strains of *Staphylococcus aureus* in mixed culture. *Journal of General Microbiology*, 69:229-237.

- LACEY, R.W., 1972. Genetic control of methicillin-resistance strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 5:497-508.
- LACEY, R.W., 1975. Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriological Review*, 39:1-32.
- LACEY, R.W., 1980. Evidence for two mechanisms of plasmid transfer in mixed cultures of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, 119:423-435.
- LACEY, R.W. e I. CHOPRA, 1974. Genetic studies of a multi-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 7:285-297.
- LACEY, R.W. e J. GRINSTED, 1973. Genetic analysis of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; evidence for their evolution from a single clone. *Journal of Medical Microbiology*, 6:511-526.
- LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG, 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63:399-406.
- MATHEWS, M.M., 1963. Comparative study of lethal photosensitization of *Sarcina lutea* by 8-methoxypsoralen and by toluidine blue. *Journal of Bacteriology*, 85:322-328.

MAY, J.W., R.H. HOUGHTON e C.J. PERRET, 1964. The effect of growth at elevated temperature on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 37:157-169.

MENEZES, E.M., J.L. AZEVEDO e C. BALL, 1973. Efeito da luz ultravioleta longa e 8-metoxipsoralen (8-MOP) em 4 linhagens de *Aspergillus nidulans*. Relatório Científico (Instituto de Genética/ESALQ/USP), 7:110-112.

MITSUHASHI, S., H. HASHIMOTO, M. KONO e M. MORIMURA, 1965. Drug resistance of staphylococci. II. Joint elimination and joint transduction of penicillinase production and resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 89:988-992.

MITSUHASHI, S., M. MORIMURA, K. KONO e H. OSHIMA, 1963. Elimination of drug resistance of *Staphylococcus aureus* by treatment with acriflavina. *Journal of Bacteriology*, 86:162-164.

NOVICK, R., 1963. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology*, 33:155-166.

OGINSKY, E.L., G.S. GREEN, D.G. GRIFFITH e W.L. FOWLKS, 1959. Lethal . photosensitization of bacteria with 8-methoxypsoralen to long wave length ultraviolet radiation. *Journal of Bacteriology*, 78:821-833.

OSHIMA, H., U. KAWAHARADA, T. KASUGA e S. MITSUHASHI, 1967. Changes in the phage-typing patterns of Staphylococci following lysogenization. *Japanese Journal of Microbiology*, 11:129-132.

PATTEE, P.A., 1978. Genetic analysis in *Staphylococcus aureus*: an overview with emphasis on chromosome analysis by transformation. *Microbial Genetics Bulletin*, 45:15-18.

PULVERER, G., J. PILLICH, A. KLEIN e M. KRIVÁNKOVÁ, 1974. Studies on lysogeny of *Staphylococcus albus*. *Medical Microbiology and Immunology*, 159:115-119.

RHODES, P.M., N. WINSKILL, E.J. FRIEND e M. WARREN, 1981. Biochemical and genetic characterization of *Streptomyces rimosus* mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis. *Journal of General Microbiology*, 124:329-338.

ROSENDAL, K. e P. BÜLOW, 1965. Temperate phages influencing lipase production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, 41:349-356.

ROUNTREE, P.M., 1951. The role of certain electrolytes in the adsorption of staphylococcal bacteriophages. *Journal of General Microbiology*, 5:673-680.

RUBIN, S.J. e E.D. ROSENBLUM, 1971. Effects of ethidium bromide on growth and on loss of penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 108:1200-1204.

SCHIMMER, O., 1977. Untersuchungen zur mutagenen wirksamkeit von cumarinderivaten in *Chlamydomonas*. II. Die induktion extranucleärer mutaten durch xanthotoxin in kombination mit langwelligem UV. *Mutation Research*, 44:33-42.

SCHIMMER, O. e G. HAUBER, 1977. Untersuchungen zur mutagenen wirksamkeit von cumarinderivaten in *Chlamydomonas*. I. Der einfluss von licht verschiedener wellenlängenbereiche auf die mutationsinduktion durch xanthotoxin in einer argininbedürftigen mutante. *Mutation Research*, 44:21-31.

SCOTT, B.R., 1976. Failure to detect a mutagenic activity of 8-methoxypsoralen (in the dark) in strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 40:167-168.

SCOTT, B.R. e T. ALDERSON, 1971. The random (non-specific) forward mutation of gene loci in *Aspergillus nidulans* conidia after photosensitization to near-ultraviolet light (365 nm) by 8-methoxypsoralen. *Mutation Research*, 12:29-34.

SCOTT, B.R., M.A. PATHAK e G.R. MOHN, 1976. Molecular and genetics basis of furocoumarin reactions. *Mutation Research*, 39:29-74.

SEKI, T., K. NOZU e S. KONDO, 1978. Differencial causes of mutation and killing in *Escherichia coli* after psoralen plus light treatment: monoadducts and cross-links. *Photochemistry and Photobiology*, 27:19-24.

SIERRA, G., 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology*, 23:15-20.

SIMPSON, I.N. e C.E. CATEN, 1979a. Induced quantitative variation for penicillin titre in clonal population of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 110:1-12.

SIMPSON, I.N. e C.E. CATEN, 1979b. Recurrent mutation and selection for increased penicillin titre in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 113:209-217.

SIQUEIRA JR., J.P. e J.L. AZEVEDO, 1978a. Efeito do brometo de etídio em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a drogas. *Revista de Microbiologia*, 9:137-141.

SIQUEIRA JR., J.P. e J.L. AZEVEDO, 1978b. Tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Genetics Bulletin*, 45:33-34.

SIQUEIRA JR., J.P. e J.L. AZEVEDO, 1980. Effect of 8-methoxypsoralen plus near-UV light, and some chemical agents in a *Staphylococcus aureus* lipase-negative strain. *Microbial Genetics Bulletin*, 48:4-5.

SJÖSTRÖM, J.E. e L. PHILIPSON, 1974. Role of the Ø 11 phage genome in competence of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 119:19-32.

SOLE-VERNIN, C., 1976. Fagotipagem de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 11:31-34.

SONG, P.S., W.W. MANTULIN, D. MC INTURFF, I.C. FELKNER e M.L. HARTER, 1975. Photoreactivity of hydroxypsoralens and their photobiological effects in *Bacillus subtilis*. *Photochemistry and Photobiology*, 21:317-324.

SONSTEIN, S.A. e J.N. BALDWIN, 1972a. Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus*, with sodium dodecyl sulfate. *Journal of Bacteriology*, 109:262-265.

SONSTEIN, S.A. e J.N. BALDWIN, 1972b. Nature of the elimination of the penicillinase plasmid from *Staphylococcus aureus* by surface-active agents. *Journal of Bacteriology*, 111:152-155.

STIFFLER, P.W., H.M. SWEENEY e S. COHEN, 1974. Co-transduction of plasmids mediating resistance to tetracycline and chloramphenicol in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 120:934-944.

STOBBERINGH, E.E. e K.C. WINKLER, 1977. Restriction-deficient mutants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, 99:359-367.

SWANBECK, G. e M. THYRESSON, 1974. Induction of respiration-deficient mutant in yeast by psoralen and light. *The Journal of Investigative Dermatology*, 63:242-244.

TOWNSED, M.E., H.M. WRIGHT e D.A. HOPWOOD, 1971. Efficient mutagenesis by near ultraviolet light in the presence of 8-methoxypsoralen in *Streptomyces*. *Journal of Applied Bacteriology*, 34:799-801.

TROOST, T. e E. KATZ, 1979. Phenoxazinone biosynthesis: accumulation of a precursor, 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid, by mutants of *Streptomyces parvulus*. *Journal of General Microbiology*, 111:121-132.

VENTURINI, S., M. TAMARO, C. MONTI-BRAGADIN e F. CARLASSARE, 1981. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of some angelicin derivatives proposed as new monofunctional agents for the photochemotherapy of psoriasis. *Mutation Research*, 88:17-22.

VERONESE, F.M., O. SCHIAVON, R. BEVILACQUA e G. RODIGHIERO, 1979.

Drug-protein interaction: 8-methoxypsoralen as photosensitizer of enzymes and amino acids. *Zeitschrift für Naturforschung*, 34c:392-396.

WAHL, R. e J. FOUACE, 1961. Résistance instable phénotypique a l'érythromycine ches *Staphylococcus pyogenes*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 101:722-737.

WEBB, R.B., 1978. Near-UV mutagenesis: photoreactivation of 365 nm induced mutational lesions in *Escherichia coli* WP2s. *Journal of Bacteriology*, 133:860-866.

WYMAN, L., R.V. GOERING e R.P. NOVICK, 1974. Genetic control of chromosomal and plasmid recombination in *Staphylococcus aureus*. *Genetics*, 76:681-702.

YOAKUM, G.H. e R.S. COLE, 1978. Cross-linking and relaxation of supercoiled DNA by psoralen and light. *Biochimica et Biophysica Acta*, 521:529-546.

DATILOGRAFIA: *Cleusval Bissi*

REPRODUÇÃO FOTOSTÁTICA: *Lázaro Martins*

REPRODUÇÕES FOTOGRÁFICAS: *José Broglia*

MONTAGEM: *José Broglia*

CAPA: *Tipografia Piracicabana*

Esta Tese foi concluída no ano do

80º aniversário da ESALQ/USP

PIRACICABA (1901 - 1981)