INFLUÊNCIA DO PLASMÍDIO R NA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO EM *Escherichia coli*

SILVIA MARIA FRIGO

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1980

.i.

À meus pais

e irmã

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

A todos que direta e indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho queremos agradecer e, em especial a:

- *Prof. João Lúcio de Azevedo*, pela orientação, confiança e amizade.
- *Prof. Edmar Chartone de Souza*, pelo auxílio, sugestões e companheirismo durante a realização dessa tese.
- *Prof.^a Consuelo Margarida Rubio de Biagi e Prof.^a Aline Aparecida Pizzirani Kleiner*, pelas valiosas sugestões durante o decorrer desse trabalho e também pela revisão cuidadosa do manuscrito.
- *Prof. Flávio Cesar Almeida Tavares*, pela amizade e constante estímulo.
- *Instituto de Genética da ESALQ/USP*, na pessoa de seu Diretor *Prof. Ernesto Paterniani*, pela acolhida e utilização de instalações e equipamentos.
- *Professores do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas*, pela contribuição para nossa formação científica e amizade.
- *Colegas e amigos do curso de Pós-Graduação*, pela convivência, alegrias e esperanças compartilhadas e, em particular àqueles do *Setor de Microrganismos*.

- Funcionários do Setor de Genética e Microrganismos: *Antonio José Rocha Campos, Luís Próspero, Rodolfo Fulin*i, *Salvador Peixe* e *Orlando Bueno Cardoso*, pela importância e eficiência dos serviços técnicos prestados.
- Funcionários do Instituto de Genética, representados na pessoa de sua secretária, *Érica Spruck*, pelo excelente atendimento.
- *Sr. Cleusval Bissi*, pela datilografia.
- *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, pelo auxílio financeiro concedido para a realização desse trabalho.
- *Irvo Martins*, pela compreensão e incentivo.
- Amigas da "Toca dos Anjos": *Janete R. Salum*, *M. Lúcia Noronha Duarte*, *Sidneide Manfredini*, *Lúcia Zanete* e *M. Angélica Calazans*, por todos esses anos de convivência, estímulo e amizade.

CURRICULUM VITAE

SILVIA MARIA FRIGO, natural de Limeira (SP), filha de Euclides Antonio Frigo e Adelina Peixoto Frigo, obteve o título de licenciada no curso de História Natural da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Rio Claro.

Foi admitida, por concurso público na E.E.P.G. "Prof. Abigail de Azevedo Grillo", onde é atualmente professora efetiva de Ciências. Obteve ingresso no curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, onde desenvolve pesquisa na área de Genética de Microrganismos.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.	6
3.1. O fenômeno da instabilidade	6
3.1.1. Aspectos gerais.	6
3.1.2. Instabilidade em bactérias	10
3.1.3. Instabilidade devido a plasmídios.	15
3.2. Antimutagênicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Linhagens utilizadas.	24
4.1.1. Linhagem de <i>Escherichia coli</i> J ₅	24
4.1.2. Linhagem de <i>Escherichia coli</i> 99.	24
4.1.3. Linhagem de <i>Escherichia coli</i> K ₁₂ 712 R	24
4.2. Drogas antimicrobianas	25
4.3. Meios de cultura e soluções usadas.	25
4.3.1. Nutriente Ágar (NA) Difco	25
4.3.2. Nutriente líquido (NL) Difco	26
4.3.3. Meio Mínimo sólido (MM).	26

	<u>Página</u>
4.3.3. Solução salina (0.85%)	27
4.3.5. Solução de Atebrina (10 mg/ml) (At). .	27
4.3.6. Solução de Aminoácidos (10 mg/ml) . . .	28
4.4. Preparo das drogas	28
4.4.1. Ácido Nalidíxico (Nx).	28
4.4.2. Cloranfenicol (Cm)	28
4.4.3. Tetraciclina (Tc).	28
4.4.4. Bicloreto de mercúrio (Hg); Canamicina (Km); Estreptomicina (Sm) e Hetacili- na (He)	29
4.5. Esterilização e incubação	29
4.6. Determinação dos níveis de resistência. . . .	29
4.7. Isolamento de mutantes com resistência cromos- sômica ao Ácido Nalidíxico	31
4.8. Transferência das marcas de resistência . . .	32
4.9. Comparação da frequência de reversão de au- xotrofia para prototrofia entre linhagens por- tadora e não portadora de plasmídeo	34
4.9.1. Preparo do inóculo	34
4.9.2. Preparo das placas	34
4.9.3. Determinação da frequência de reversão..	35

Página

4.10. Uso de Atebrina (Quinacrina) como antimutagênico.	35
4.10.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).	35
4.10.2. Determinação do número de divisões na presença de atebrina.	36
4.10.3. Comparação da frequência de reversão de auxotrofia para prototrofia entre linhagens portadoras e não portadoras de plasmídeo na presença e ausência de atebrina	38
4.11. Determinação do número de divisões em meio contendo estreptomicina	38
4.12. Determinação da frequência de mutação para resistência à estreptomicina entre a linhagem portadora e não portadora de plasmídeo	41
4.12.1. Comparação da frequência de mutação para resistência à estreptomicina na presença e ausência de atebrina . . .	42
4.13. Teste de flutuação	42
5. RESULTADOS	44
5.1. Níveis de resistência das linhagens	44
5.2. Isolamento de mutantes com resistência cromossômica ao ácido nalidíxico	45

	<u>Página</u>
5.3. Transferência das marcas de resistência . . .	46
5.4. Comparação da frequência de reversão de auxo- trofia para prototrofia entre linhagens porta- dora e não portadora de plasmídeo	49
5.5. Determinação da CMI da atebrina nas linhagens <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} e <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99	49
5.6. Determinação do número de divisões na presen- ça de atebrina	51
5.7. Determinação da frequência de reversão de au- xotrofia para prototrofia nas linhagens de <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} e <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99 em presença e ausência de atebrina	51
5.8. Determinação do número de divisões em meio contendo estreptomicina	53
5.9. Frequência de mutação para resistência à es- treptomicina nas linhagens de <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} e J ₅ ^{Nx} 99	53
5.10. Teste de flutuação.	54
6. DISCUSSÃO	56
6.1. Níveis de resistência, isolamento de mutantes ao ácido nalidíxico e transferência de marcas de resistência	56

Página

6.2. Comparação da frequência de reversão entre linhagens portadoras e não portadoras de plasmídeo	58
6.3. Influência da atebrina na frequência de reversões	60
6.4. Frequência de mutação para resistência a estreptomicina em linhagens portadora e não portadora de plasmídeo	62
7. CONCLUSÕES	67
8. SUMMARY.	69
9. LITERATURA CITADA.	71

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Quantidade e diluições apropriadas das drogas a partir de solução de 10 mg/ml para resultar nas concentrações finais desejadas..	30
2 - Níveis de resistência em µg/ml de 3 linhagens de <i>Escherichia coli</i> frente a sete drogas.	44
3 - Resistência das linhagens de <i>E. coli</i> J ₅ e <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} ao ácido nalidíxico	45
4 - Transferência de marcas de resistência da linhagem <i>E. coli</i> 99 para <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx}	47
5 - Caracterização da linhagem <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99 e sua comparação com a linhagem <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} mutante	48
6 - Frequência de reversão da deficiência em Prolina e Metionina nas linhagens <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} e <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99	50
7 - Número de gerações, taxa de geração e concentração de bactérias/ml da linhagem <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx}	51
8 - Frequência de reversão para prolina na linhagem <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} na presença e ausência de atebrina	52

TabelaPágina

9	-	Frequência de reversão para prolina na linhagem <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99 na presença e ausência de atebrina	52
10	-	Frequência de mutação para resistência a estreptomicina em linhagens portadoras e não portadoras de plasmídeo em <i>E. coli</i>	54
11	-	Teste de flutuação para as linhagens <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} e <i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99 (resistência a estreptomicina na presença e ausência de atebrina)	55

1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, verificar a influência do plasmídeo R na frequência de mutação em *Escherichia coli*, comparando-se a frequência de reversão espontânea de auxotrofia para prototrofia entre linhagens portadoras (*E. coli* J₅^{Nx} 99) e não portadoras de plasmídios (*E. coli* J₅^{Nx}). A influência do plasmídeo na emergência de mutantes resistentes à estreptomicina, bem como a avaliação do efeito antimutagênico da atebrina (quinacrina) na frequência de reversões e mutações foram também avaliadas nessas duas linhagens.

Verificou-se que a linhagem portadora do plasmídeo apresentou um aumento na frequência de reversão espontânea para metionina na ordem de 1,29 a 54,33 vezes e de 2,22 a 11,56 para prolina. A presença desse plasmídeo aumentou significativamente o número de mutações para resistência à estreptomicina. Esse aumento foi da ordem de 99,03 a 343,4 vezes maior quando comparado com o da linhagem sem plasmídeo. Este

dado pode ser de grande importância pelos problemas clínicos que acarreta.

Quanto a influência da atebrina na frequência de reversão para prototrofia e resistência a estreptomicina um ligeiro decréscimo foi detectado, quando se considera a totalidade dos experimentos. Contudo, para conclusões definitivas um maior número de dados será necessário.

2. INTRODUÇÃO

Com o advento da antibioticoterapia a partir do início da década dos 40s e com sua larga aplicação nos anos subsequentes, criou-se a falsa impressão de que os problemas ocasionados pelas infecções bacterianas seriam facilmente resolvidos. No entanto, essa ilusão pouco durou, pois, ao lado dos benefícios que os antibióticos trouxeram principalmente ao homem, concomitantemente, surgiu o problema de formas resistentes, tornando seu uso muitas vezes ineficaz.

A causa desse insucesso, com um número considerável de antibióticos que se sucederam, é decorrente das próprias leis que regem a genética bacteriana.

As bactérias, como todos os seres vivos, apresentam variabilidade genética que é obtida por mutação e recombinação. Através dessa variabilidade, esses organismos podem tornarem-se resistentes às drogas, não só por um mecanismo de resistência ditado por genes localizados no cromossomo

(resistência cromossômica), como também ocorre uma resistên
cia extracromossômica.

Principalmente esse segundo tipo de resistên
cia tem sido intensivamente pesquisada dada a sua enorme im
portância aplicada e, por outro lado, muitos tipos de elemen
tos extracromossômicos (plasmídios) já foram descritos.

Entre eles, podemos citar o plasmídio R, que em
geral, proporciona resistência à múltiplas drogas na bactéria
que o carrega. Esse plasmídio R pode ser transferido de uma
célula para outra com alta frequência e assim são transfери
das resistência à vários antibióticos e quimioterápicos. Des
sa maneira, a disseminação da resistência múltipla às drogas
em bactérias é muito fácil, não só entre as células da mesma
espécie, como também em bactérias de, inclusive, gêneros dife
rentes.

Estudos recentes, mostraram que o plasmídio R
de *Salmonella typhimurium*, além de condicionar a resistência
à drogas, tem também a capacidade de proteger a célula hospe
deira dos efeitos letais da luz UV, aumentar o efeito mutagê
nico da mesma e também de aumentar a frequência de mutações
espontâneas, na bactéria portadora desse plasmídio. Se esse
fato for comprovado para outros plasmídios e outras espécies
bacterianas, o problema da resistência à drogas tornar-se-á
mais agudo. Bactérias portadoras de plasmídio teriam então

maior capacidade de desenvolver resistência à novas drogas.

Torna-se portanto, de grande importância, um estudo da influência de plasmídios afetando a frequência total de mutações em bactérias e o estudo das causas reais desse aumento de mutação. Além disso, pode-se pensar na possibilidade do desenvolvimento de técnicas que visem impedir a emergência de novas formas resistentes.

É conhecido o fato que certas drogas tem efeito antimutagênico, isto é, reduzem a taxa de mutação espontânea em bactérias (HAHN, 1976). Nesse caso, a emergência de formas resistentes poderia em parte ser diminuída, se essas drogas pudessem ser administradas antes ou em associação com antibióticos. Contudo, são necessários mais estudos para que soluções desse tipo possam ser conseguidas.

Tendo em vista esses fatos, o presente trabalho tem como principais objetivos:

a) Comparação da frequência de reversão de auxotrofia para prototrofia em bactérias portadoras e não portadoras de plasmídios.

b) Influência do plasmídio na emergência de formas resistentes à drogas para as quais ele não confere resistência.

c) Avaliação do efeito antimutagênico da atebrina (quinacrina) na frequência de mutação de uma mesma linhagem com e sem plasmídio.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Uma vez que no presente trabalho vários aspectos da resistência antimicrobiana foram abordados, a revisão, para um melhor entendimento será dividida em dois sub-ítems: Instabilidade e Antimutagênicos.

3.1. O fenômeno da instabilidade

3.1.1. Aspectos gerais

Os primeiros estudos de mutações que ocorrem com altas frequências e estão associadas a genes mutadores datam da época pouco posterior a redescoberta das leis de Mendel (*EMERSON, 1914 e 1917*). Estudos subsequentes em *Drosophila* *viridis* (*DEMEREK, 1941*) evidenciaram o caráter autônomo de diversos genes mutadores que conduziam a um comportamento genético instável. Outros casos de instabilidade foram descri

foi por *McCLINTOCK* (1951) em milho, originando o conceito de "elementos controladores". Ainda em milho, *GREENBLATT* (1968), sugeriu que a transposição ocorria apenas na fase de replicação tanto do cromossomo quanto do elemento transponível, estando envolvidos, nesse caso, tanto a transposição quanto a duplicação. Uma visualização bastante interessante da instabilidade provocada por alterações qualitativas e quantitativas do material genético foi observado em *Nicotiana* (*BURNS e GERSTEL*, 1967), *Antirrhinum* (*HARRISON*, 1971, *SASTRY*, 1976, *HARRISON e CARPENTER*, 1977; milho (*GAVAZZI e col.*, 1977). Infelizmente nesses casos não foi possível o isolamento de tais regiões mutadas para posteriores cruzamentos e estudos genéticos.

Também entre os animais, desenvolveu-se especial atenção ao estudo das aberrações cromossômicas envolvendo transposições em *Drosophila*. *GREEN* (1967, 1969 e 1973), estudando esse inseto analisou a instabilidade do locus "white" relacionada à transposição de um "elemento controlador" que provoca reversão (pela liberação de tal elemento) e instabilidade. Ainda em *Drosophila*, genes instáveis são revistos por *ALDERSON* (1966) e casos de instabilidade são descritos em mamíferos como o *Hamster* (*HUGHES e AUSTIN*, 1966) e homem (*RETHORE e col.*, 1974).

Dentre os microrganismos, diversos casos de instabilidade foram relatados e *BARNETT e DeSERRES* (1963) su

sugeriram que um caso de instabilidade observado em *Neurospora*, poderia ser correlacionado às mudanças do tipo transição de bases. *NEWMAYER* (1965) e *NEWMAYER e TAYLOR* (1967) analisaram instabilidade relacionada a inversão pericêntrica, dando origem, através de permutações simples a dois produtos: um duplicado e outro deficiente e letal. Duplicações relacionadas a translocações e quebras, produzindo derivativos euplóides foram observados por *TURNER* (1975, 1977) e mutantes que aumentam a frequência de deleções e possivelmente de permuta, em *Neurospora* foram descritos por *NEWMAYER e GALEAZZI* (1977). Esses mutantes foram analisados com relação a sensibilidade à luz ultravioleta, recombinação, reparo e suas implicações no aumento da instabilidade (*NEWMAYER e GALEAZZI*, 1978; *NEWMAYER, SCHROEDER e GALEAZZI*, 1978).

Também em *Saccharomyces* casos de instabilidade relacionados a perdas de segmentos cromossômicos (*HABER*, 1974; *CAMPBELL e col.*, 1975), duplicação e fusão gênica (*BOLLON*, 1975; *HANSCHÉ, BERES e LANGE*, 1978) e transposição (*LATEN e col.*, 1976) foram descritos.

Ainda em fungos (*BAINBRIDGE e ROPER*, 1966; *NGA e ROPER*, 1968) sugeriram que a instabilidade esteja em grande parte relacionada a presença de material genético em excesso. Linhagens com segmento cromossômico em duplicata são instáveis na mitose, sofrendo frequentemente trocas intracromossômicas, que podem envolver um ou ambos segmentos presentes

em duplicata. Variantes melhorados surgem através de deleções e, deteriorados originam-se de novas duplicações em tandem e de transposições do segmento extra para novos sítios de inserção, no mesmo ou em outro grupo de ligação (AZEVEDO e ROPER, 1970). A esse tipo de instabilidade foi dado o nome de "*não conformidade mitótica*" (NGA e ROPER, 1969; AZEVEDO e ROPER, 1970 e ROPER, PALMER e WATMOUGH, 1972).

Uma série extensa de trabalhos envolvendo diversos aspectos da instabilidade em *A. nidulans* podem ser citados entre os quais destacamos: BALL (1967); AZEVEDO (1971, 1975); BURR e col., (1971); MENEZES (1974); CASE e ROPER (1975); ZUCCHI (1975); ALMEIDA (1976); BALL e AZEVEDO (1976); AZEVEDO, SANTANA e BONATELLI (1977); PIZZIRANI (1977); GABRIELLI (1978); MENEZES e AZEVEDO (1978) e NIFFINEGGER-SOUZA (1979).

Entre os procariotos, a adição de segmentos estruturalmente definidos em plasmídeos, fagos, e cromossomos bacterianos e a excisão de segmentos específicos de DNA de tais elementos pode representar o principal mecanismo na evolução de pro e talvez de eucariotos (COHEN, 1976; DOOLITTLE, 1978). Além disso, estudos comparativos dos efeitos produzidos por elementos genéticos transponíveis (transposons) em plasmídios e em eucariotos sugerem que segmentos de DNA podem desempenhar importante papel na organização e controle da expressão da informação genética também em organismos superiores (COHEN, 1976; REANNEY, 1976; HELINSKY, 1976; COHEN e KOPECKO, 1976).

Certas semelhanças entre transposons e elementos de inserção com outros tipos de sistemas translocacionais são citados em *E. coli* (COHEN, 1976), milho (RHOADES, 1941; MCCLINTOCK, 1951, 1953, 1955, 1965; PETERSON, 1970a, 1970b, 1976; PINCHAM e SASTRY, 1974; COHEN e KOPECKO, 1976), *Salmonella* (DAWSON e SMITH-KEARY, 1963), *Drosophila* (GREEN, 1975).

Transposições desempenhando importante papel na diferenciação de células formadoras de anticorpos (HOZUMI e TONEGAWA, 1976) é também citado assim como os "elementos transponíveis" no fungo *A. nidulans*, (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970).

Em todos os casos apresentados a presença da duplicação não só provoca deleção de segmentos, mas também novas duplicações em tanden, as quais podem causar maior ou menor instabilidade.

Uma observação bastante interessante é o fato de que o comportamento desses sistemas instáveis é bastante semelhante seja em bactéria, milho, fumo, *Drosophila*, rato e homem.

3.1.2. Instabilidade em bactérias

Dentre os microrganismos, em especial as bactérias, diversos casos de instabilidade tem sido relatados e,

TREFFERS e col., (1954) e GOLDSTEIN e SMOOT (1955) correlacionaram altas taxas de mutação para resistência auxotrófica em *E. coli* com genes mutadores.

Genes mutadores são considerados entidades que podem ser mapeadas no cromossomo e induzem um aumento apreciável na taxa de mutação em outros genes, sendo que esse aumento ocorre na ausência de agentes mutagênicos físicos e químicos. Genes desse tipo já foram detectados em várias linhagens bacterianas incluindo *E. coli*, *Salmonella typhimurium* (MIYATAKE, 1960), *Proteus mirabilis* (BÖHME, 1967), *Neisseria meningitidis* (JYSSUM, 1968) e *Bacillus subtilis* (GROSS, KARAMATA e HEMPSTEAD, 1968).

Vários mecanismos de ação foram postulados para os genes mutadores. Entretanto, questões rudimentares a respeito da genética formal e envolvimento fisiológico e bioquímico de cada gene mutador na replicação do DNA são falhas, o que torna difícil descrever em detalhes moleculares o nível em que cada produto do gene mutador está envolvido na transmissão da informação genética.

Para o caso do gene *mut T*, COX e YANOFSKY, (1969); HANAWALT e HAYNES (1965) demonstraram que a ação mutadora seria consequência de um sistema defeituoso de reconhecimento de erro, associado com a replicação de DNA (COX, 1973), os quais permitiriam que certas classes de erros de pareamen

to de bases fossem fixados durante a replicação subsequente. Consequentemente a célula mutante exibiria uma sensibilidade aumentada à inativação aos danos do DNA, acompanhada pelo aumento da mutabilidade espontânea. Esse modelo de ação é também postulado para o gene mutador estudado por MOHN e KAPLAN (1967) em *E. coli*, JYSSUM (1968) em *N. meningitidis* e por BÖHME (1967) em *Proteus mirabilis*.

YANOFSKY, CORN e HORN (1966) observaram também que esse gene aumenta exclusivamente a taxa de transversão de A:T $\rightarrow$ C:G. Como consequência dessa conversão unidirecional de pares de bases, observa-se um pequeno aumento do conteúdo de C:G do mutante *mut* T₁, aumento esse que ocorre durante crescimento prolongado. Além disso, considera-se (COX, 1973) que a ação desse gene pode ser suprimida pelo supressor *sum* 44 (isolado e mapeado por RAY, 1979), e que duplos mutantes (*mut* T₁ *dna* E) apresentam alterações na morfologia da célula e síntese de DNA. Foi também descrita em *E. coli* uma instabilidade mutacional relacionada ao gene supressor "ocre" (BRIDGES e col., 1971).

Como um segundo modelo de ação, WEINBERG e LATHAN (1956), COUGHLIN e ADELBERG (1956) sugerem que o alelo mutador resulte de uma mutação no gene estrutural ou regulador envolvido na síntese de bases, o que poderia causar a insuficiência de uma base. Consequentemente, tal insuficiência poderia ser mutagênica da mesma maneira que a morte por

Falta de timina (starvation) (COHEN e BARNER, 1954).

Sobre esse assunto, COUGHLIN e ADELBURG (1956) inferem que a mutação bacteriana pode ser consequência de uma interrupção no metabolismo do DNA e concluem que a falta específica de timina é mutagênica em *E. coli*, pelo menos para a propriedade fenotípica estudada ou seja, isolamento de mutantes *his*⁺.

Um fato interessante foi observado por BRESLER e col., (1970) os quais relacionaram que mutantes induzidos nessas condições continham lesões genéticas em diferentes cistrons que codificavam para a síntese de aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, etc. e que, o raro fenômeno de mutagênese completa resultava de erros na replicação, induzida pela baixa replicação de DNA ou por um desequilíbrio de precursores do mesmo.

Outra possível alternativa para a ação de genes mutadores foi postulada por KIRCHNER (1960) e KIRCHNER e RUDDEN (1966) em *S. typhimurium*, os quais consideram que esses genes podem causar mudança qualitativa na síntese de bases, que resultaria na formação de bases análogas mutagênicas, acarretando erros na replicação.

Por outro lado, o gene mutador poderia também produzir uma DNA polimerase mutada a qual permitiria erros na replicação do material genético. Tal DNA polimerase mutante

foi considerada por *SPEYER (1965)* como sendo a responsável pelo grande aumento na frequência de mutação reversa exibida por vários mutantes do fago T₄, sensíveis à temperatura. Uma vez que esses mutantes foram mapeados no gene 43, foi sugerido que uma mutação "*missense*" no gene estrutural da DNA polimerase fago específica, produzia uma enzima alterada que não selecionava as bases. Desse modo, bases não complementares poderiam ser inseridas mais frequentemente no DNA desses mutantes durante a replicação, o que levaria ao aumento na taxa de mutação.

A evidência concreta para essa idéia porém, foi proporcionada por *HALL e LEHMAN (1968)*. Esses autores demonstraram uma frequência de erros no DNA sintetizado "*in vitro*", por uma polimerase mutante purificada de células infectadas com L₅₆ (mutante do fago T₄ e que possui gene mutador). Posteriormente, *DRAKE e ALLEN (1968)*, *DRAKE e col., (1969)* descreveram uma série de mutantes do gene 43, sensíveis à temperatura, os quais tinham taxa de mutação marcadamente reduzida e os designou de antimutadores.

Para explicar como diferentes mutações podem levar a fenômenos opostos, isto é, mutador e antimutador, *MUZYZKA, POLAND e BESSMAN (1972)* propuzeram que a taxa de mutação espontânea reflete a taxa relativa de inserção e remoção de nucleotídeos no terminal 3' da cadeia, durante a síntese de DNA.

Um outro modo de ação sugere que o gene mutador pode alterar o ambiente intracelular o que levaria a erros na replicação. Dessa maneira foi demonstrado que com aumento na concentração de Mn^{++} , uma DNA polimerase purificada pode ter a sua especificidade alterada de tal modo que, tanto ribonucleotídeos como desoxiribonucleotídeos são incorporados no DNA (BERG, FANCHER e CHAMBERLIN, 1963) causando mutações em bactérias (DEMEREK e HANSEN, 1951) e fagos (ORGEL e ORGEL, 1965). Porém não se sabe se esse mecanismo é operante "*in vitro*".

3.1.3. Instabilidade devido a plasmídios

Como já citado, o problema *instabilidade* é bastante complexo e várias são as causas e explicações para sua ocorrência, assim como são vários os padrões de instabilidade. Em bactérias, além da presença de genes mutadores foram descritos casos de instabilidade relacionados à reversão de marcas auxotróficas (DARLINGTON, 1966; KINGSMAN e col., 1978) e biossíntese de aminoácidos (RIYASATY, 1966). Outros autores consideram que a instabilidade em bactérias seja consequência de alguma forma de interação entre cromossomo e um elemento de natureza epissômica ou plasmidial (GUNDERSEN, JYSSUM e LIE, 1962), sendo que DAWSON e SMITH-KEARY (1963) sugerem o nome de "*epissomos controladores*" aos elementos responsáveis

pela instabilidade em *Salmonella*.

Plasmídeos R de resistência são elementos genéticos extracromossômicos que medeiam resistência a várias substâncias antibacterianas, incluindo antibióticos, quimioterápicos e sais de metais (SMITH, 1967; SMITH e DAVIS, 1967). Originalmente esses elementos foram encontrados em espécies de *Shigella* no Japão (WATANABE, 1963). Subsequentemente foram observados em todo mundo e com uma distribuição em todas as espécies de bactérias entéricas, sendo atualmente considerados a base comum para a resistência às drogas entre todos os organismos isolados.

O mecanismo pelo qual os fatores R conferem resistência às drogas é de grande interesse uma vez que médicos, dentistas, agrônomos, veterinários, etc., acham-se diante de um problema complexo, com profundas implicações de ordem clínica, ética e epidemiológicas, já que a transferência desse material genético extracromossômico pode ocorrer entre bactérias pertencentes a uma mesma espécie como também entre bactérias de espécies diferentes.

A resistência bacteriana associada com plasmídeo R foi considerada por algum tempo, como resultado do decréscimo da permeabilidade às drogas (POLLOCK, 1960 e RICHMOND, 1965); evidências posteriores contudo, sugerem que esses plasmídeos possuem genes para enzimas individuais que inativam o

cloranfenicol (OKAMOTO e SUZUKI, 1965; SHAW e BRODSKY, 1968), canamicina (OKAMOTO e SUZUKI, 1965; UMEZAWA e col., 1967), ampicilina (ANDERSON e DATTA, 1965; DATTA e KONTOMICHALOU, 1965).

Sabe-se também que os plasmídios determinam caracteres não essenciais, comumente ausentes no reservatório gênico bacteriano. Entretanto, alguns plasmídios são importantes para promover a transferência intercelular de genes bacterianos.

Descobertas ulteriores (JACOB e WOLMAN, 1961) e LURIA (1962) postularam que alguns plasmídios regulam a atividade biossintética da bactéria a nível gênico, estimulando, inibindo ou mesmo modificando a expressão fenotípica de genes específicos. Por outro lado, BUTTIN, JACOB e MONOD, 1960; YARMOLISNKY, JORDAN e WEISMAYER (1960), LURIA (1962) indicaram que os plasmídios podem estimular a atividade de genes bacterianos sob condições especiais. No entanto supressão total de funções genéticas normais por plasmídios não foi observado, pelo menos em bactérias.

Uma observação bastante interessante é que merece atenção especial devido as implicações clínicas e biológicas que acarreta, é o fato de certos plasmídios, tais como os plasmídios R ou os colicinogênicos, reduzirem a susceptibilidade de seus hospedeiros dos efeitos letais da irradiação U.V., aumentando porém, o efeito mutagênico da mesma com respeito a reversão de certas mutações causadoras do caráter au

xotrófico (HOWARTH, 1965, 1966; DRABBLE e STOCKER, 1968; SICCAR DI, 1969; Mac PHEE, 1972, 1973a, 1973b; KRISHNAPILLAI, 1975; BABUDRI e MONTI-BRAGATIN, 1977; LEHRBACH, 1977; WALKER, 1977; KRONISH e WALKER, 1979).

Além desses fatos, foi ainda observado, que o plasmídeo R₄₆ (MORTELMANS e STOCKER, 1976) em adição a esses efeitos, aumenta também a frequência de reversão espontânea de algumas mutações de ponto (mutantes *his*) em derivados de *S. typhimurium* (MORTELMANS e STOCKER, 1974, 1976 e 1979). A essa capacidade do plasmídeo de aumentar a frequência de reversão espontânea, esses mesmos autores (MORTELMANS e STOCKER, 1979) utilizam o termo "*mutador*", em analogia com o termo utilizado para genes localizados no cromossomo (genes mutadores), para diferenciar da habilidade do mesmo de aumentar o efeito mutagênico da luz U.V.

Contudo, o mecanismo (s) responsável por esses fenômenos são desconhecidos, embora uma possibilidade óbvia seja que o plasmídeo produza ambos efeitos (proteção e aumento da mutagênese), por aumentar a capacidade do hospedeiro, no reparo de danos do DNA produzidos pela luz U.V., por algum processo sujeito a erros.

A hipótese considera que o R₄₆ especifica uma DNA polimerase mais sujeita a provocar erros nas trocas de bases que a enzima hospedeira normal. Essa (s) enzima portanto,

seria utilizada especificamente para reparar quebras no DNA causadas pela luz U.V. (explicando o efeito protetor e aumento mutagênico da mesma) e também na replicação de bactérias não irradiadas (explicando a ação mutadora).

Considerando essa hipótese, apenas um gene plasmidial seria responsável pelo efeito mutador, proteção a luz U.V. e aumento mutagênico. Entretanto, esses efeitos, não foram observados em hospedeiros mutantes *rec A*, embora não fossem diminuídos em hospedeiros *uvr B* e num mutante *pol A* (falta atividade da DNA polimerase I "*in vitro*"). Esses fatos, levaram MORTELMANS e STOCKER (1979) a proporem que a ação do R₄₆ (e muitos derivados, incluindo o pKM 101), resulte da atividade de um gene *uvr* (proteção a U.V.) ou genes que causam aumento da capacidade de reparo e que outros plasmídios possuem genes com ação similar a esse.

Uma observação bastante interessante, é que alguns, mas nem todos plasmídios que protegem as células dos efeitos letais da luz U.V., aumentam a frequência de reversão espontânea de mutações *his G₄₆* (MORTELMANS, 1979); portanto, o grau desse efeito varia de acordo com o plasmídio.

Várias formas mutantes do R₄₆, mostraram que as propriedades: proteção e aumento mutagênico da luz U.V., eram determinadas por dois ou mais genes. Destes, um denominado *uvr*, aumentava a capacidade de reparo sujeito a erros,

causando assim proteção e aumento do efeito mutagênico da luz U.V. Outro gene (s) na ausência do *uvr* aumentavam grandemente a frequência de reversão espontânea (propriedade mutadora) do gene cromossômico *his* G₄₆ (MORTELMANS e STOCKER, 1979).

3.2. Antimutagênicos

Um dos principais obstáculos na terapêutica com antibióticos tem sido a frequente emergência de bactérias resistentes.

Casualmente, genes para resistência à antibióticos foram incorporados aos plasmídios. Devido a fantástica pressão de seleção que foi aplicada durante os últimos vinte anos, esses plasmídios de resistência se disseminaram por todo mundo.

Em geral, resistência, determinada por estes elementos extracromossômicos constitui um problema médico mais sério do que a determinada pela resistência cromossômica. Esses elementos sem o devido controle estão sendo os grandes responsáveis pela volta do tratamento das infecções à era pré-antibiótica (COSTA, 1974; TRABULSI, 1973 e 1975; CAMPOS, AZEVEDO e COSTA, 1976).

Tendo em vista tão grave problema, inúmeros tra

balhos foram e continuam a ser realizados, visando a possibilidade da interferência na expressão genética dos plasmídios R. De fato, algumas drogas como os agentes intercalantes, por exemplo, demonstraram ser capazes de causar a eliminação ou "cura" de plasmídios, tornando, assim, bactérias resistentes em sensíveis. Entre essas drogas podemos citar os corantes de acridina (CHABBERT, 1964; HIROTA, 1960), brometo de etídio (BOUANCHAUD, SCAVIZZI e CHABBERT, 1969; SIQUEIRA JR. e col., 1975), dodecil sulfato de sódio (TOMOEDA e col., 1968) e clo₂ridrato de guanidina (COSTA, 1978) e outros.

Os primeiros estudos sobre antimutagênicos, em bactérias foram iniciadas por NOVICK e SZILARD (1952). Durante uma investigação sobre a ação mutagênica de vários derivados das purinas, foi observado que a guanosina impedia a emergência de mutantes resistentes ao fago T₅ em *E. coli*. Eles observaram também, que mutações induzidas por vários mutagênicos químicos, assim como mutação espontânea de *E. coli* ao fago T₅, eram fortemente diminuídas pela guanosina. Outros nucleosídeos apresentaram também o mesmo efeito antimutagênico. Entretanto o mecanismo deste efeito permaneceu obscuro. Recentemente CLARKE e SHANCKEL (1975), sugerem que os nucleosídeos atuem prevenindo a indução de um sistema de reparo sujeito a erros (portanto mutagênico), cuja ação é induzida em resposta a lesões no DNA.

Estudos subsequentes de WEBB e KUBITSCHKE (1963),

com compostos intercalantes tais como acridina orange (na ausência de luz), demonstraram que estas substâncias reduzem a taxa de mutação induzida pela cafeína em 70%, assim como a taxa de mutação espontânea de *E. coli* ao fago T₅. Esses autores propuseram que a complexa intercalação da acridina orange com o DNA e a estabilização resultante, eram responsáveis pelo efeito antimutagênico.

Também em *Staphylococcus aureus* e *Aerobacter aerogenes*, SEVAG e DRABBLE (1962), registraram que a presença de espermina impedia o aparecimento de mutantes ã estreptomicina e penicilina, o que levou os autores a proporem que "poliaminas podem atuar como antimutagênicos".

Considerando que o efeito antimutagênico da espermina resultava da formação de um complexo DNA-espermina, SEVAG (1964), SEVAG e ASHTON (1969) investigaram a ação antimutagênica de outra aminoacridina (quinacrina). Essa substância anti-malárica, semelhante a espermina, estabiliza o DNA contra desnaturação pelo calor (KREY e HAHN, 1974) e é, o protótipo das aminoacridinas intercalantes do DNA (KREY, 1962; LERMAN, 1963).

Dando continuidade a esses estudos, BACH e JOHNSON (1971) examinaram 200 compostos para a atividade antimutagênica de prevenir o aparecimento de mutantes resistentes ã estreptomomicina em *E. coli*, portadora de um gene mutador. Para

vários desses compostos, correlação dose/resposta foi similar a da quinacrina. Ainda que o mecanismo detalhado da ação de antimutagênicos não seja bem conhecida, um considerável volume de estudos (Ver revisão de *CLARKE e SHANKEL, 1975 e HAHN, 1976*), leva-nos a concluir que a quinacrina e outros compostos cujas estruturas satisfazem o requerimento obrigatório de intercalação no DNA atuam como antimutagênicos. Muitos trabalhos inclusive, relativos a utilização da quinacrina (e outros antimutagênicos) em combinação com antibióticos na prevenção de doenças infecciosas foram realizados (*SHARDA, CORNFELD e MICHIE, 1966; ESHLEMAN e col., 1970*).

Infelizmente falta ainda uma melhor elucidação da ação dos antimutagênicos à nível molecular. São necessários também estudos principalmente em terapia experimental e clínica, da utilização do princípio antimutagênico, na supressão de mutações para resistência à drogas, em organismos, cujos eventos mutacionais impedem o sucesso das mesmas, na medicina curativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas

4.1.1. Linhagem de *Escherichia coli* J₅

Mutante auxotrófico, deficiente para prolina e metionina.

4.1.2. Linhagem de *Escherichia coli* 99

Prototrófica e portadora de plasmídeo R, que confere resistência ao cloranfenicol (200 µg/ml), canamicina (200 µg/ml), tetraciclina (200 µg/ml) bicloreto de mercúrio (50 µg/ml).

4.1.3. Linhagem de *Escherichia coli* K₁₂ 712 R

Resistente à estreptomicina (1.000 µg/ml), au

xotrófica para prolina, histidina, triptofano e incapaz de utilizar lactose como fonte de carbono.

A linhagem de *Escherichia coli* J₅ foi cedida pelo Prof. Gilberti Moreno, do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, UNESP, Campus de Botucatu; a linhagem *E. coli* 99 e *E. coli* K₁₂ por Chartone-Souza, da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2. Drogas antimicrobianas

Ácido nalidíxico (Nx)	-	Winthrop Products Inc.
Bicloreto de mercúrio (Hg)	-	E. Merck.
Sulfato de canamicina (Km) e Hetacilina potássica (He)	-	Laborterápica Bristol S.A.
Cloranfenicol (Cm)	-	Parke-Davis Ltda.
Sulfato de estreptomicina (Sm)	-	Fontoura - Wyeth Indústrias Far macêuticas S.A.
Tetraciclina (Tc)	-	Pfizer Inc.

4.3. Meios de cultura e soluções usadas

4.3.1. Nutriente Ágar (NA) Difco

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g

Ágar	15,0 g
Água destilada esterilizada.	1.000 ml

4.3.2. Nutriente líquido (NL) Difco

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada esterilizada.	1.000 ml

4.3.3. Meio Mínimo sólido (MM)

Preparado de acordo com AZEVEDO e NEDER (1963).

Fórmula 10 x forte

K ₂ HPO ₄	105 g
KH ₂ HPO ₄	45 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0 g
MgSO ₄ x7 H ₂ O.	2,5 g
Citrato de Sódio x5 H ₂ O	4,7 g
Ágar	16,0 g
Água destilada esterilizada.	1.000 ml
Glicose, concentração final.	0,2%
pH	7,2

Todos os componentes, com exceção do sal de magnésio foram colocados em frasco contendo 1.000 ml de água destilada. Após completa dissolução, o sal foi adicionado e a solução autoclavada.

A solução de glicose foi esterilizada separadamente.

No momento do uso preparou-se 500 ml de ágar duplo concentrado (16 g/500 ml) e após esterilização adicionou-se à solução salina (diluída de 1:10), juntamente com a glicose (para concentração final 0,2%).

4.3.4. Solução salina (0.85%)

NaCl.	8,5 g
Água destilada esterilizada	1.000 ml

Colocou-se 9,0 ml da solução salina em frascos, autoclavou-se e manteve-se à temperatura ambiente.

4.3.5. Solução de Atebrina (10 mg/ml) (At) (Quinacrina-dehydrochloride-Sigma)

Atebrina	100 mg
Solução salina	10 ml

A solução foi mantida em frasco escuro à 4°C.

4.3.6. Solução de Aminoácidos (10 mg/ml)

Metionina (M)	100 mg
Prolina (P)	100 mg
Cada um dos aminoácidos foi diluído em água destilada esterilizada	10 ml

4.4. Preparo das Drogas

4.4.1. Ácido Nalidíxico (Nx)

Ácido Nalidíxico.	100 mg
NaOH (0,1N)	0,2 ml
Água destilada esterilizada	9,8 ml

4.4.2. Cloranfenicol (Cm)

Cloranfenicol	100 mg
Álcool metílico	1,0 ml
Água destilada esterilizada	9,0 ml

4.4.3. Tetraciclina (Tc)

Tetraciclina	100 mg
Ácido clorídrico (0.1 N)	1,0 ml
Água destilada esterilizada	9,0 ml

4.4.4. Bicloreto de mercúrio (Hg); Canamicina (Km);
Estreptomicina (Sm) e Hetacilina (He):

Droga	100 mg
Água destilada esterilizada	10 ml

4.5. Esterilização e incubação

A esterilização dos meios foi feita em auto
clave por 15 minutos à 1 atmosfera de pressão.

A temperatura de incubação em todos experimen
tos foi de 37°C.

4.6. Determinação dos níveis de resistência

Os níveis de resistência das linhagens foram
determinados pelo método da diluição em placas. Quantidades
adequadas de cada droga em solução (Tabela 1), completadas pa
ra 20 ml com nutriente ágar, mantidos à 45°C, foram coloca
dos em tubos de ensaios e a seguir, agitados e distribuídos
em placas de Petri. Após a solidificação do meio de cultura,
as placas foram conservadas entreabertas em estufa asséptica
para eliminação do excesso de umidade.

Tabela 1 - Quantidade e diluições apropriadas das drogas a partir de solução de 10 mg/ml para resultar nas concentrações finais desejadas.

Quantidade da solução adicionada/placa, com pletadas p/20 ml c/NÁ	Diluição da solução da droga	Concentração final da droga/placa ($\mu\text{g/ml}$)
0,2 ml	10^{-2}	1
0,4 ml	10^{-2}	2
1,0 ml	10^{-2}	5
2,0 ml	10^{-2}	10
0,4 ml	10^{-1}	20
0,8 ml	10^{-1}	40
1,0 ml	10^{-1}	50
2,0 ml	10^{-1}	100
0,4 ml	S/D	200
1,0 ml	S/D	500
2,0 ml	S/D	1.000

Amostras das linhagens foram incubadas em nutriente líquido por 18 a 20 hs e a seguir inoculadas por estrias nas placas contendo antibióticos.

A linhagem de *E. coli* K₁₂ foi utilizada como indicadora ou controle da atividade das drogas, uma vez que, seus níveis de resistência foram previamente determinados (CHAR

TONE-SOUZA, 1975).

A viabilidade das amostras foi verificada inoculando-se as mesmas em meio isento da droga.

Após o período de incubação de 24 hs, procedeu-se a observação do crescimento das amostras. Na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e nível de resistência das linhagens, utilizou-se o seguinte critério: quando a linhagem tinha o seu crescimento impedido, por exemplo, por uma concentração de 20 µg/ml, esta era considerada a CMI para essa linhagem enquanto que, seu nível de resistência seria a concentração imediatamente inferior, ou seja, 10 µg/ml.

4.7. Isolamento de mutantes com resistência cromossômica ao Ácido Nalidíxico

O isolamento de mutantes foi feito pelo método da placa gradiente (SZYBALSKY, 1951), fazendo-se duas transferências no ácido nalidíxico. Os gradientes utilizados foram os seguintes:

1º) 0 a 20 µg/ml

2º) 0 a 50 µg/ml

As colônias que apareceram no último gradiente

foram transferidas para nutriente ágar e mantidas em estoque.

Para confirmação da mutação para resistência, esses isolados assim como a linhagem original, foram novamente semeados em placas de Petri contendo nutriente ágar acrescido de 0, 5, 10, 20, 30 e 50 µg/ml de ácido nalidíxico. Após 24 hs de incubação foi observado o crescimento das colônias.

4.8. Transferência das marcas de resistência

Para a transferência das marcas de resistência da linhagem doadora para a linhagem receptora, foi utilizado o processo da conjugação (*LEDERBERG e TATUM, 1946*).

As linhagens foram cultivadas separadamente em 10 ml de nutriente líquido por um período de 18 a 20 hs. A seguir, 0,1 ml da cultura doadora e 0,9 ml da receptora foram inoculadas num mesmo tubo com 9 ml de nutriente líquido. Após a incubação, sem agitação, por um período de 4 a 5 hs, semeou-se 0,1 dessa cultura em placas seletoras.

Foram utilizadas placas seletoras para cada marca cuja transferência estava sendo pesquisada, (Cm, Tc, Km, Hg e He). Cada placa seletora além da droga pesquisada continha 10 µg/ml de ácido nalidíxico.

Para o controle as linhagens doadora e recepto

ra foram semeadas nas placas a, b, c, d.

As placas continham:

Placa a - Nutriente ágar e ácido nalidíxico na mesma concentração das placas seletoras.

Placa b - Nutriente ágar e canamicina ou cloranfenicol ou tetraciclina ou bicloreto de mercúrio ou hetacilina na mesma concentração das placas seletoras.

Placa c - Nutriente agar, ácido nalidíxico e canamicina ou cloranfenicol ou tetraciclina ou bicloreto de mercúrio ou hetacilina na mesma concentração das placas seletoras.

Placa d - Nutriente ágar isento de drogas.

As placas controle e seletoras assim preparadas eram incubadas durante 24 hs. Após esse período de tempo observou-se o crescimento das amostras. Quando a transferência de resistência era constatada procedia-se a purificação da amostra.

4.9. Comparação da frequência de reversão de auxotrofia para prototrofia entre linhagens portadora e não portadora de plasmídeo

4.9.1. Preparo do inóculo

Pequena quantidade de células provenientes de culturas de 24 hs, de linhagens auxotróficas de *E. coli*, cuja reversão se queria ensaiar, foram inoculadas isoladamente em frascos contendo 10 ml de nutriente líquido e incubadas sem agitação, por um período de 24 hs. Em seguida as culturas foram centrifugadas à 5.000 rpm (Sorval Superspeed RC 2B) por 10 minutos, os sobrenadantes retirados e os sedimentos ressuspensos em 10 ml de solução salina. Essas suspensões foram novamente centrifugadas (5.000 rpm/10 min) e os sedimentos ressuspensos em 10 ml de solução salina, obtendo-se uma suspensão bacteriana com cerca de 10^9 células por ml.

4.9.2. Preparo das placas

Preparou-se diferentes séries de placas contendo meio mínimo acrescido de prolina (50 µg/ml) e meio mínimo acrescido de metionina (50 µg/ml). Os meios foram enriquecidos com nutriente líquido (0,01%). O enriquecimento dos meios de cultivo foi realizado a fim de que as bactérias apresentas

sem um certo número de divisões no meio mínimo, possibilitando dessa forma o aparecimento de mutações retardadas (delayed mutations) (DEMEREC, 1972).

Como controle foram preparadas placas contendo meio mínimo e placas contendo meio mínimo acrescido de prolina e metionina (50 µg/ml de cada droga). Após a solidificação dos meios, semeou-se 0,1 ml da suspensão bacteriana por placa.

A leitura das placas foi efetuada após 3 a 4 dias de incubação.

4.9.3. Determinação da frequência de reversão

A frequência de reversão foi calculada comparando-se o número de reversões dos tratamentos com o número de colônias crescidas na placa controle. Foram efetuadas cinco repetições para cada linhagem e para cada tratamento.

4.10. Uso de Atebrina (Quinacrina) como antimutagênico

4.10.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Antes de se verificar a ação da atebrina como

antimutagênico determinou-se sua concentração mínima inibitória frente as linhagens.

O meio de cultura utilizado para esse ensaio foi nutriente ágar acrescido de atebrina nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1.000 µg/ml (ítem 4.6.). Após a solidificação do mesmo as linhagens foram semeadas por estrias e incubadas.

O preparo, inoculação e incubação das placas foi realizado em ausência de luz, uma vez que a atebrina é de composta pela mesma. .

4.10.2. Determinação do número de divisões na presença de atebrina

Utilizou-se o método de lavagem por inundação de *DEMEREK e CAHN (1953)*, modificado. A linhagem em estudo foi inoculada em 10 ml de nutriente líquido e incubada por 24 hs. A seguir, a cultura foi centrifugada segundo o mesmo procedimento citado no ítem 4.9.1., obtendo-se uma concentração ao redor de 10^9 células/ml. Dessa suspensão, 0,1 ml foi semeado por espalhamento nas placas *a* e *b*.

Essas placas continham:

Placa *a* - Meio mínimo acrescido de metionina (50 µg/ml) (2 placas).

Placa b - Meio mínimo acrescido de metionina e atebrina (50 µg/ml). (2 placas).

Duas dessas placas (1a e 1b) foram incubadas durante 4 hs. Nas placas 2a e 2b, imediatamente após a semeadura adicionou-se 1 ml de solução salina. Com o auxílio da alça de Drygalsky, retirou-se as bactérias da superfície e as mesmas foram recuperadas com o auxílio de uma pipeta e diluídas.

Aproximadamente 0,1 ml das diluições aproprias foram semeadas em nutriente ágar e incubadas por 24 hs.

Após 4 hs, o mesmo procedimento foi realizado para as placas 1a e 1b. Como controle foram utilizadas séries de placas contendo meio mínimo acrescido de prolina (50 µg/ml), meio mínimo acrescido de metionina (50 µg/ml) e meio mínimo acrescido de ambos aminoácidos. Paralelamente preparou-se uma nova série de placas contendo atebrina (50 µg/ml), juntamente com os aminoácidos. Em ambas as séries semeou-se por espalhamento, 0,1 ml das diluições apropriadas da suspensão bacteriana. As placas controle foram incubadas nas mesmas condições dos tratamentos.

4.10.3. Comparação da frequência de reversão de auxotrofia para prototrofia entre linhagens portadoras e não portadoras de plasmídeo na presença e ausência de atebrina

Preparou-se uma série de placas contendo meio mínimo acrescido de metionina (50 µg/ml) e outra série contendo meio mínimo com metionina e atebrina (50 µg/ml).

Nas placas controle, adicionou-se prolina, metionina e atebrina (50 µg/ml de cada). Após a solidificação dos meios, 0,1 ml da suspensão bacteriana foi semeada por espalhamento, sendo que nas placas controle foram utilizadas diluições adequadas.

A leitura das placas foi efetuada após 4 dias de incubação.

A determinação da frequência de reversão na presença e ausência de atebrina foi realizado pela metodologia citada no item 4.9.3.

4.11. Determinação do número de divisões em meio contendo estreptomicina

Para essa determinação foi utilizado o método citado no item 4.10.2., com algumas modificações. Assim, pequena quantidade de célula da linhagem a ser estudada foi

inoculada em 100 ml de nutriente líquido e incubadas com agitação por 24 hs. Após esse período, 4 alíquotas (25 ml cada) foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos. A seguir retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em 10 ml de solução salina e novamente centrifugado (5.000 rpm/10 min).

Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 ml de solução salina por tubo; seus conteúdos após agitação foram reunidos num frasco único (20 ml). Essa suspensão foi novamente centrífugada e ressuspendida em 10 ml de solução salina, obtendo-se uma concentração ao redor de 10^{12} células/ml.

Dessa suspensão 0,1 ml foi semeada por espalhamento nas placas *a* e *b*.

Essas placas continham:

Placa a - Nutriente ágar e estreptomicina
(50 µg/ml) (3 placas).

Placa b - Nutriente ágar, estreptomicina e atebrina (50 µg/ml) (3 placas).

Duas dessas placas (1a e 1b) foram incubadas durante 30 minutos e duas outras (2a e 2b) foram incubadas durante 1 hora. Nas duas placas restantes (3a e 3b), imediatamente após a semeadura adicionou-se, 3 ml de solução salina. Com o auxílio da alça de Drygalsky as bactérias do meio foram

suspensas em solução salina sendo as mesmas recuperadas com pipeta e colocadas em frascos contendo 7 ml de solução salina.

A seguir, essa suspensão recuperada foi diluida; 0,1 ml e as diluições apropriadas tanto das bactérias recuperadas do meio contendo atebrina como do meio isento de atebrina foram semeadas em nutriente ágar e incubadas por 24 hs.

Após meia e após uma hora, o mesmo procedimento foi repetido para as placas restantes (1a, 1b e 2a, 2b).

Na determinação do título, diluições apropridas da suspensão original foram semeadas em nutriente ágar e incubadas.

O número de divisões foi obtido de acordo com a equação para cálculo do número de gerações em bactérias (*STANIER e col., 1969*).

$$N^{\circ} \text{ de gerações} = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2}$$

onde:

N_1 = número de colônias crescidas após 4 hs de incubação.

N_0 = número inicial de colônias no tempo 0.

Taxa de geração = N° de geração/tempo.

Tempo de geração = $1/\text{taxa de geração}$.

4.12. Determinação da frequência de mutação para resistência à estreptomicina entre a linhagem portadora e não portadora de plasmídeo

O preparo do inóculo seguiu o mesmo procedimento utilizado no ensaio de reversão (Ítem 4.9.1.) exceto que as linhagens para as quais as frequências de mutação seriam determinadas foram inoculadas isoladamente em 100 ml de nutriente líquido e incubadas com agitação por 24 hs. A ressuspensão final de células foi feita em 10 ml de solução salina.

Para ambas linhagens foram preparadas séries de placas contendo nutriente ágar acrescido de estreptomicina, na concentração de 20 µg/ml. Foi utilizada esta concentração, pois as linhagens de *E. coli* utilizadas mostraram-se sensíveis à essa concentração em experimento prévio.

Tanto nas placas controle (contendo nutriente ágar) como nos tratamentos foram semeados por espalhamento, (0,1 ml/placa) diluições apropriadas das suspensões bacterianas. A leitura dos tratamentos foi feita após 2 e 3 dias de incubação e das placas controle após 24 hs.

4.12.1. Comparação da frequência de mutação para resis tência à estreptomicina na presença e ausência de atebrina

Para essa determinação o procedimento foi se
melhante ao citado no ítem 4.12. com adição no entanto, de uma
nova série de placas contendo nutriente ágar, estreptomicina
(20 µg/ml) e atebrina (50 µg/ml). Nas placas controle adi
cionou-se somente atebrina (50 µg/ml). A contagem das colô
nias nas placas controle foi feita após 24 hs e nos tratamen
tos após 3 dias de incubação.

4.13. Teste de flutuação

Para verificar se os mutantes obtidos para re
sistência à estreptomicina eram selecionados pela droga ou in
duzidos por ela, foi utilizado o teste de Flutuação de *LURIA*
e *DELBRUCK (1943)*, modificado por *De COURCY JR. (1971)*.

Assim, amostras das linhagens a serem estuda
das foram inoculadas em 9 ml de nutriente líquido e incuba
das com agitação durante 24 hs. A seguir, 0,1 ml dessas solu
ções foram distribuídas em frascos contendo 20 ml de nutrien
te líquido. Após a incubação por 24 hs, sob agitação, os con
teúdos de cada frasco (31 frascos) foram centrifugados à
5.000 rpm durante 15 minutos e ressuspensos em 2 ml de so

lução salina. Metade do conteúdo de cada frasco foi introduzido em tubos com nutriente ágar (45°C) e estreptomicina (100 µg/ml) e o restante em tubos contendo nutriente ágar(45°C), estreptomicina (100 µg/ml) e atebrina (50 µg/ml). O conteúdo dos tubos foi imediatamente vertido em placas de Petri.

As placas controle foram feitas semeando-se 0,2 ml da suspensão do frasco restante numa série de placas contendo nutriente ágar, estreptomicina e, nutriente ágar, estreptomicina e atebrina nas mesmas concentrações citadas anteriormente.

A contagem das colônias foi feita após 3 dias de incubação.

5. RESULTADOS

5.1. Níveis de resistência das linhagens

Os resultados do ensaio das linhagens *E. coli* J₅, *E. coli* 99 e *E. coli* K₁₂ frente as drogas utilizadas feito se gundo o método de diluição em placas descritos no ítem 4.6., estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Níveis de resistência em µg/ml de 3 linhagens de *Escherichia coli* frente a sete drogas.

Drogas	L i n h a g e n s		
	J ₅	99	K ₁₂
Nx	5	1	1
Hg	5	50	5
Km	1	200	1
Cm	1	200	1
Sm	5	10	1.000
He	10	20	1
Tc	5	200	>1

5.2. Isolamento de mutantes com resistência cromossômica ao ácido nalidíxico

O isolamento foi realizado com a finalidade de se obter uma linhagem receptora apropriada para o experimento descrito no item 4.8., ou seja, uma linhagem não portadora de plasmídeo R, mas resistente ao ácido nalidíxico.

Para a linhagem original *E. coli* J₅ foram feitas duas transferências para gradientes crescentes (item 4.7.). As colônias crescidas no último gradiente foram ensaiadas quanto a sua resistência ao ácido nalidíxico e os resultados para um isolado resistente obtido e para a linhagem original, são apresentados na Tabela 3. A linhagem resistente isolada foi denominada *E. coli* J₅^{Nx}.

Tabela 3 - Resistência das linhagens de *E. coli* J₅ e *E. coli* J₅^{Nx} ao ácido nalidíxico.

Concentrações de Ácido Nalidíxico (µg/ml)	L i n h a g e n s	
	J ₅	J ₅ ^{Nx}
0	+	+
1	+	+
2	+	+
5	+	+
10	-	+
20	-	+
30	-	+
50	-	+
100	-	-

+ crescimento; - ausência de crescimento.

5.3. Transferência das marcas de resistência

A Tabela 4 apresenta os resultados referentes à pesquisa de transferência de marcas da linhagem doadora (*E. coli* 99) para a receptora (*E. coli* J₅^{Nx}). Observa-se pelos resultados que foram transferidas 5 marcas de resistência uma vez que a linhagem receptora tornou-se resistente ao cloranfenicol (200 µg/ml), tetraciclina (200 µg/ml), bicloreto de mercúrio (20 µg/ml), canamicina (200 µg/ml) e hetacilina (20 µg/ml), apesar de continuar auxotrófica para os aminoácidos prolina e metionina.

Observa-se também, que a resistência ao ácido nalidíxico na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} caiu de 50 µg/ml para 20 µg/ml, o mesmo ocorrendo na resistência ao bicloreto de mercúrio.

Para uma caracterização e comparação, a linhagem resistente ao ácido nalidíxico (*E. coli* J₅^{Nx}) e o possível recombinante foram semeados por estrias em placas contendo nutriente ágar acrescido de tetraciclina (100 µg/ml), cloranfenicol (100 µg/ml), bicloreto de mercúrio (20 µg/ml) e ácido nalidíxico nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml.

Para verificar-se a auxotrofia das linhagens, ambas foram semeadas em placas contendo meio mínimo, meio mínimo acrescido de prolina, meio mínimo acrescido de metioni

na e, meio mínimo acrescido de ambos aminoácidos, nas mesmas concentrações anteriormente utilizadas (Ítem 4.9.2.). Os resultados após 24 hs de incubação são apresentados na Tabela 5.

O recombinante assim obtido, resistente ao ácido nalidíxico e que recebeu o plasmídeo com as diferentes marcas foi denominado *E. coli* J₅^{Nx} 99.

Tabela 4 - Transferência de marcas de resistência da linhagem *E. coli* 99 para *E. coli* J₅^{Nx}.

Linhagens	Níveis de resistência/μg/ml					
	Km	Cl	Tc	Hg	He	Nx
<i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx}	1	1	5	10	10	50
<i>E. coli</i> 99	200	200	200	50	20	1
<i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99	200	200	200	20	20	20

Tabela 5 - Caracterização da linhagem *E. coli* J₅^{Nx} 99 e sua comparação com a linhagem *E. coli* J₅^{Nx} mutante.

Meios	Drogas	Concentração (µg/ml)	Linhagens	
			J ₅ ^{Nx}	J ₅ ^{Nx} 99
NA	Tc	100	-	+
NA	Cm	100	-	+
NA	Km	100	-	+
NA	Hg	20	-	+
NA	Nx	10	+	+
		20	+	+
		30	+	-
		40	+	-
		50	+	-
MM+P			-	-
MM+M			-	-
MM+P+M			+	+
MM			-	-

P = Prolina

M = Metionina

+ = Crescimento

- = Ausência de crescimento

5.4. Comparação da frequência de reversão de auxotrofia para prototrofia entre linhagens portadora e não portadora de plasmídeo

Os resultados mostram que na maioria dos experimentos (total de 5 repetições) a linhagem portadora do plasmídeo R (*E. coli* J₅^{Nx} 99) apresentou maior número de reversões tanto para prolina como para metionina, quando comparada com a mesma linhagem sem plasmídeo. Contudo, as frequências de reversões nos diversos experimentos variaram bastante em ambas linhagens como pode ser observado na Tabela 6.

5.5. Determinação da C M I da atebrina nas linhagens *E. coli* J₅^{Nx} e *E. coli* J₅^{Nx} 99

Através do método utilizado no item 4.10.1. pode-se observar após o período de incubação que tanto a linhagem mutante (*E. coli* J₅^{Nx}) como a linhagem portadora de plasmídeo R (*E. coli* J₅^{Nx} 99), cresceram normalmente em todas as concentrações de atebrina utilizadas, ou seja, até 1.000 µg/ml.

Tabela 6 - Frequência de reversão da deficiência em Prolina e Metionina nas linhagens *E. coli* J₅^{Nx} e *E. coli* J₅^{Nx} 99.

Exp. Nº	Linhagens	Títulos	Reversões x 10 ⁸ células	
			Metionina	Prolina
1	J ₅ ^{Nx}	1,49 x 10 ⁹	9,58	9,12
	J ₅ ^{Nx} 99	2,15 x 10 ⁹	77,20	54,88
2	J ₅ ^{Nx}	4,92 x 10 ⁸	10,77	20,73
	J ₅ ^{Nx} 99	2,52 x 10 ⁸	139,68	239,68
3	J ₅ ^{Nx}	2,05 x 10 ⁸	1,02	3,34
	J ₅ ^{Nx} 99	3,10 x 10 ⁸	5,23	2,63
4	J ₅ ^{Nx}	9,00 x 10 ⁸	0,51	0,66
	J ₅ ^{Nx} 99	2,70 x 10 ⁸	0,66	1,47
5	J ₅ ^{Nx}	1,49 x 10 ⁹	0,06	0,33
	J ₅ ^{Nx} 99	2,15 x 10 ⁹	3,26	3,26

5.6. Determinação do número de divisões na presença de atebrina

Para essa determinação utilizou-se a linhagem *E. coli* J₅^{Nx}. A concentração de bactérias obtidas nos tempos de 0 e 4 hs, seguiu o método citado anteriormente (item 4.10.2.).

O número e taxa de geração dessa linhagem calculadas conforme descrito no item 4.11., são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Número de gerações, taxa de geração e concentração de bactérias/ml da linhagem *E. coli* J₅^{Nx}.

Linhagem	Tempo (horas)	Concentração/ml	Nº de gerações	Taxa de geração
J ₅ ^{Nx}	0	$6,8 \times 10^6$	4,25	1,06
	4	$1,3 \times 10^8$		

5.7. Determinação da frequência de reversão de auxotrofia para prototrofia nas linhagens de *E. coli* J₅^{Nx} e *E. coli* J₅^{Nx} 99 em presença e ausência de atebrina

Nas Tabelas 8 e 9 estão os resultados obtidos nesse experimento. Para a linhagem *E. coli* J₅^{Nx} foram realizadas 3 repetições enquanto que para a linhagem *E. coli* J₅^{Nx} 99 efetuaram-se 4.

Os resultados referem-se a reversões para prolina em ambas linhagens, na presença e ausência de atebrina.

Tabela 8 - Frequência de reversão para prolina na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} na presença e ausência de atebrina.

Exp.	Sem Atebrina		Com Atebrina	
	Título	Rev. (x10 ⁸ cêls.)	Título	Rev. (x10 ⁸ cêls.)
1	2,89 x 10 ⁸	5,95	9,10 x 10 ⁷	0
2	3,60 x 10 ⁸	3,89	6,50 x 10 ⁷	4,61
3	1,82 x 10 ⁸	51,10	2,22 x 10 ⁷	24,36
	TOTAL	60,94	TOTAL	28,97

Tabela 9 - Frequência de reversão para prolina na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} 99 na presença e ausência de atebrina.

Exp.	Sem Atebrina		Com Atebrina	
	Título	Rev. (x10 ⁸ cêls.)	Título	Rev. (x10 ⁸ cêls.)
1	3,12 x 10 ⁸	13,40	3,60 x 10 ⁷	2,77
2	3,60 x 10 ⁸	3,89	3,70 x 10 ⁸	5,10
3	9,50 x 10 ⁷	48,40	1,15 x 10 ⁸	27,80
4	2,38 x 10 ⁹	19,20	1,67 x 10 ⁹	20,30
	TOTAL	86,98	TOTAL	55,97

5.8. Determinação do número de divisões em meio contendo estreptomicina

Utilizando-se do método citado no item 4.12., foi calculado o número de divisões da linhagem *E. coli* J₅^{Nx} em meio contendo estreptomicina. A partir de $1,38 \times 10^9$ células adicionadas em placa com estreptomicina (tempo 0) não se obteve células viáveis após meia hora e após 1 hora de incubação.

Nesse experimento ficou evidente que a estreptomicina inibe o crescimento dessa linhagem, provavelmente não permitindo divisão alguma antes da morte da célula.

5.9. Frequência de mutação para resistência à estreptomicina nas linhagens de *E. coli* J₅^{Nx} e J₅^{Nx} 99

Conforme verifica-se pela análise da Tabela 10, a linhagem *E. coli* portadora de plasmídeo apresentou maior frequência de mutação nos 3 experimentos realizados.

Tabela 10 - Frequência de mutação para resistência a estreptomicina em linhagens portadora e não portadora de plasmídeo em *E. coli*.

Exp. Nº	Linhagens	Títulos	Mutações (10^{11} células)	Aumento (vezes)
1	J_5^{Nx}	$0,96 \times 10^{10}$	1,04	99,03
	J_5^{Nx} 99	$3,37 \times 10^{10}$	103,00	
2	J_5^{Nx}	$2,36 \times 10^{10}$	0,06	343,4
	J_5^{Nx} 99	$1,58 \times 10^{10}$	20,60	
3	J_5^{Nx}	$1,15 \times 10^9$	0,43	100,0
	J_5^{Nx} 99	$1,66 \times 10^9$	43,00	

5.10. Teste de Flutuação

Os resultados do teste de flutuação de *LURIA DELBRUCK* (1943) modificado por *De COURCY JR* (1971) são apresentados na Tabela 11. Neste experimento foram utilizadas as linhagens *E. coli* J_5^{Nx} e *E. coli* J_5^{Nx} 99. Ambas foram ensaiadas em meio contendo estreptomicina e meio com estreptomicina e atebrina. As concentrações das drogas utilizadas assim como o método empregado são citados no ítem 4.13.

Tabela 11 - Teste de flutuação para as linhagens *E. coli* J₅^{Nx} e *E. coli* J₅^{Nx} 99 (resistência à estreptomicina na presença e ausência de atebrina).

Placas Nº	L i n h a g e n s			
	J ₅ ^{Nx}		J ₅ ^{Nx} 99	
	A	B*	A	B*
01	-	-	1	0
02	1	0	0	2
03	0	1	7	4
04	1	1	3	0
05	1	3	2	5
06	0	0	3	7
07	0	0	6	8
08	1	0	2	1
09	1	1	3	1
10	0	0	2	5
11	1	1	8	10
12	-	0	18	7
13	2	0	2	2
14	1	0	2	0
15	-	0	0	4
16	0	0	0	0
17	3	0	0	0
18	5	1	2	8
19	1	0	14	9
20	0	0	6	1
21	18	18	3	2
22	-	-	0	3
23	0	0	1	3
24	1	0	13	11
25	0	0	0	0
26	0	1	0	0
27	0	0	0	0
28	2	3	25	24
29	0	0	0	2
30	0	0	1	0
31	-	-	2	3
32.1	4	2	3	2
32.2	3	3	3	3
32.3	1	4	5	4
32.4	2	2	5	0
32.5	2	2	5	0
TOTAL	51	43	147	131

A = NA + Sm; B* = NA + Sm + At; -- Dados não obtidos

6. DISCUSSÃO

6.1. Níveis de resistência, isolamento de mutantes ao ácido nalidíxico e transferência de marcas de resistência

Pelos resultados obtidos, referentes aos níveis de resistência (Tabela 2) confirmou-se a sensibilidade da linhagem *E. coli* J₅ às drogas ensaiadas. Por outro lado, a linhagem *E. coli* 99 (confirmando os dados de CHARTONE-SOUZA (1975), que verificou a presença do plasmídeo R nessa linhagem), mostrou-se resistente ao bicloreto de mercúrio, canamicina, cloranfenicol e tetraciclina.

No entanto, contrariando os dados de CHARTONE-SOUZA (1975), observou-se que essa linhagem mostrou-se sensível a hetaciclina. Este resultado pode ser explicado pela perda espontânea do plasmídeo que contém o gene que confere resistência a essa droga. Como bem demonstrado por OLIVEIRA (1980) o gene para resistência a hetaciclina em uma linhagem similar à *E. coli* 99 está localizada em plasmídeo diferen

te daquele que confere resistência às outras drogas. No presente caso, uma possibilidade plausível seria a ocorrência da perda desse plasmídeo e conservação do outro que confere resistência às outras drogas. Através da técnica da placa gradiente (Tabela 3) obteve-se um derivado da linhagem *E. coli* J₅, cerca de dez vezes mais resistente ao ácido nalidíxico, que a linhagem original. Através da conjugação transferiu-se o plasmídeo R da linhagem *E. coli* 99 para o mutante obtido (*E. coli* J₅^{Nx}), construindo-se assim, a linhagem necessária às próximas etapas do trabalho. A linhagem *E. coli* J₅^{Nx} 99 assim obtida apresenta portanto, o plasmídeo R da linhagem *E. coli* 99 e, resistência ao ácido nalidíxico. Embora o plasmídeo tenha sido transferido, comparando-se a resistência na linhagem original (*E. coli* 99) e na receptora (*E. coli* J₅^{Nx} 99) verificou-se (Tabela 4), que o nível de resistência ao bicloreto de mercúrio assim como ao ácido nalidíxico diminuiu. Portanto, tanto o gene plasmidial para resistência ao bicloreto de mercúrio como o gene cromossômico para resistência ao ácido nalidíxico sofreram alterações na sua expressão. Uma explicação possível seria que o gene que confere resistência ao mercúrio sofreu ação de genes cromossômicos da linhagem e, curiosamente o gene para resistência ao ácido nalidíxico sofreu ação dos genes plasmidiais.

Expressividade variável de um mesmo fator R em diferentes hospedeiros é conhecida há muito tempo (SMITH, 1969; GRINSTED e col., 1972; OLIVEIRA, 1980). Portanto, pode-se su

por que também na *E. coli* J₅^{Nx} 99 o determinante genético para resistência ao mercúrio esteja mais reprimido do que na *E. coli* 99, uma vez que a mesma apresentou menor nível de resistência ao mercúrio do que a linhagem doadora, conforme Tabela 5.

No entanto, como se observa nos resultados da Tabela 5, não houve variação para as marcas de auxotrofia já existentes na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} em comparação com a linhagem *E. coli* J₅^{Nx} 99.

6.2. Comparação da frequência de reversão entre linhagens portadoras e não portadoras de plasmídeo

Em enterobactérias, é sabido que linhagens portadoras de certos plasmídios, quando comparadas com linhagens não portadoras, além de apresentarem menor susceptibilidade aos efeitos letais da luz ultra-violeta, apresentam uma maior susceptibilidade aos seus efeitos mutagênicos. Esse fato foi observado tanto em *Salmonella typhimurium* portadora do plasmídeo Col I (fator colicinogênico, produtor de colicina I), como em *E. coli* portadora de plasmídeo R (Utrecht) (HOWARTH, 1966; Mac PHEE, 1973).

MORTELMANS e STOCKER (1974) e independentemente FRIGO e AZEVEDO (1975) verificaram também que linhagens

de *Escherichia coli* auxotróficas para aminoácidos, portadoras de plasmídeo R, quando comparadas com a linhagem não portadora, apresentavam maior frequência de mutações reversas espontâneas para prototrofia.

Pelos dados apresentados (Tabela 6), observou-se que em nosso caso, o aumento de reversão espontânea foi da ordem de 1,29 a 54,33 para metionina e de 2,22 a 11,56 para prolina. De 5 repetições, observou-se apenas uma exceção, onde a frequência de reversão na linhagem portadora de plasmídeo praticamente não foi alterada.

Diversas explicações, podem ser aventadas sobre essas variações obtidas. Uma delas seria a presença de clones mutantes previamente existentes na população, o que promoveria um aumento no número total de reversões. Uma segunda explicação alternativa seria a ocorrência de variações aleatórias no meio de cultura resultando dessa maneira um maior ou menor número de divisões residuais; conseqüentemente, um maior número de divisões residuais acarretaria um número também maior de reversões. Na maioria dos nossos experimentos (Tabela 6), esse parece ter sido o caso uma vez que o número de reversões foi maior ou menor para ambos marcadores genéticos utilizados. O aumento verificado tanto na reversão para metionina como para prolina indica que a ação do plasmídeo não é específica para um só locus. No entanto, somando-se os aumentos relativos (Tabela 6) de reversões para prolina (30,44) e me

tionina (81,36) observou-se que a influência do plasmídeo embora seja de aumentar essa frequência nos dois casos, é maior no caso da metionina do que no da prolina.

Os dados obtidos por nós, concordam portanto com os de *MORTELMANS e STOCKER (1979)* os quais consideram que o plasmídeo R_{46} possui um gene *uvp*, que aumenta a capacidade de reparo, sujeito a erros (explicando o efeito protetor a/e aumento mutagênico da luz U.V.). Em contraste, outro gene(s) na ausência do *uvp* seria o responsável pela elevada frequência de reversão espontânea (explicando a propriedade mutadora do plasmídeo), do gene cromossômico *his* G_{46} . Em nosso caso entretanto, não existem dados suficientes para afirmarmos se ocorrem genes no plasmídeo R utilizado, responsáveis pelo aumento observado na frequência de reversões.

6.3. Influência da atebrina na frequência de reversões

Uma série de trabalhos tem apresentado evidências que a presença de espermina, spermidina, quinacrina (atebrina) e derivados da acridina, reduzem o aparecimento de resistência espontânea em bactérias para uma série de antibióticos (*SEVAG e DRABBLE, 1962; SEVAG, 1964; DeCOURCY JR. e SEVAG, 1967 e DeCOURCY JR., 1971*). Especial atenção é dada a quinacrina (atebrina) pelo fato dessa droga atuar como an-

timutagênico prevenindo o aparecimento de mutantes resistentes à estreptomicina em *E. coli*. Outra propriedade, é que a atebrina é o protótipo das aminoacridinas intercalantes (LEHMAN, 1963), propriedade essa, importante para a atividade anttimutagênica.

Em nosso trabalho, a atebrina não se mostrou inibidora nas linhagens de *E. coli* utilizadas, até a concentração de 1.000 µg/ml. Entretanto, apesar de permitir o crescimento de ambas linhagens, reduziu o número de divisões por tempo. De fato (Tabela 7) o tempo de divisão foi cerca de uma por hora, enquanto que na ausência da droga ela foi ao redor de 20 minutos.

Com relação aos experimentos de reversão de auxotrofia para prototrofia na ausência e presença de atebrina (Tabela 8), notou-se que, de 3 experimentos realizados com a linhagem *E. coli* J₅^{Nx} (sem plasmídeo), com relação a reversão para prolina, em 2 deles a presença da droga reduziu a produção de mutantes e no terceiro, praticamente manteve-a inalterada.

Para a linhagem portadora de plasmídeo (Total de 4 repetições), em dois experimentos ocorreu um decréscimo no número de reversões para prolina enquanto que nos demais casos, essa frequência sofreu um ligeiro aumento (Tabela 9). Esses decréscimos ou aumentos (não considerando o experimen-

to 1 da Tabela 8, onde houve um caso de ausência de reversão) são de pequeno valor (0,76 até 4,83 vezes de decréscimo). Baseando-se nesses dados, não se pode assegurar que a atebrina tenha qualquer efeito em prevenir a reversão espontânea nessa linhagem.

Estudos posteriores deverão ser efetuados, alterando-se a concentração da droga e condições de cultivo para que alguma conclusão possa ser tirada nesse sentido.

Podemos afirmar apenas que, se algum efeito houver, esse efeito é mais tendente a diminuir a frequência de reversão, do que aumentá-la. De fato, comparando-se o total de reversões na presença e ausência de atebrina (Tabela 8 e 9), verificou-se que um valor maior foi encontrado quando na ausência da droga, ou seja, um valor de 2,10 vezes maior para a *E. coli* J₅^{Nx} e de 1,55 para *E. coli* J₅^{Nx} 99. Dessa forma, a atebrina comportou-se como um antimutagênico. Por outro lado, como citado inicialmente, essa substância aumentou o tempo de geração, o que possibilitaria a ocorrência de um efeito seletivo contra as reversões.

6.4. Frequência de mutação para resistência a estreptomicina em linhagens portadora e não portadora de plasmídeo

Como pode-se observar na Tabela 10, os resulta

dos com relação a mutação para estreptomicina tanto na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} como na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} 99, foram bastante conclusivos. De fato, nos três experimentos realizados, o número de mutações para resistência a estreptomicina em células portadoras de plasmídeo foi de 99,03 a 343,4 vezes maior que na linhagem isogênica sem plasmídeo. Além das implicações desse resultado do ponto de vista genético ele é também extremamente importante do ponto de vista clínico. Se esse fenômeno for encontrado em tão alto grau para outros plasmídios e outros antibióticos, isso implicaria no fato de que esses elementos, além de conferirem uma resistência microbiana às drogas de uso clínico também conferem à bactéria, uma maior possibilidade de se tornarem resistentes para outras drogas para as quais o plasmídeo não confere resistência.

Entretanto, mais pesquisas são necessárias para verificar, se o caso aqui descrito é apenas uma exceção ou pode ser ampliado a outros plasmídios, outras espécies de bactérias e outras drogas antimicrobianas.

O teste de flutuação realizado (Tabela 11) nas linhagens *E. coli* J₅^{Nx} e *E. coli* J₅^{Nx} 99 em presença e ausência de atebrina e para resistência a estreptomicina, confirmou os dados anteriores. Houve como nos outros casos um aumento da frequência de mutantes resistentes a estreptomicina para a linhagem portadora de plasmídeo. Um pequeno decréscimo foi também observado na frequência dessa mutação na presença de

atebrina. No nentanto, os dados por nós obtidos para esse teste na presença e ausência de atebrina não são tão conclusivos quanto os de *De COURCY JR. (1971)*.

Os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram um fenômeno já verificado na grande maioria dos seres vivos, qual seja, o da instabilidade genética. A linhagem utilizada de *E. coli*, portadora de plasmídio possui sem dúvida maior instabilidade que a mesma linhagem desprovida desse plasmídio. Essa instabilidade se refletiu no aumento da frequência de mutação a dois genes para auxotrofia e um para resistência à estreptomicina. Casos semelhantes de aumento generalizado na frequência de mutação já foram relatados e, diversos exemplos são citados no item 3 do presente trabalho. Dentre as explicações levantadas para o fenômeno de alta instabilidade e que também se aplicam ao presente caso, estão as dos genes mutadores e a existência de DNA adicional. O aumento da frequência de mutação devido a genes mutadores pode ser explicado por, produtos gênicos internos que se comportam como mutagênicos, deficiência de timina, DNAs polimerases que não conseguem efetuar mecanismos de reparo de maneira adequada acarretando dessa maneira erros na replicação, ou genes que causam modificações no ambiente intercelular o que leva também a erros na replicação. Para o caso específico de plasmídios bacterianos, um exemplo semelhante ao nosso é o descrito por *MORTELMANS e STOCKER (1976, 1979)* que é tentativamente explicado por esses autores pela presença de um gene plasmí-

dial denominado *uvp* que protege a célula dos efeitos letais da luz ultravioleta aumentando também a probabilidade de surgirem mutantes induzidos pela mesma. Na ausência da ação do *uvp*, outros genes seriam responsáveis pelo aumento da frequência de mutação espontânea. O plasmídeo R por nós descrito não foi analisado de modo a permitir tais conclusões uma vez que o presente trabalho visou caracterizar o fenômeno e não, o mecanismo envolvido no aumento de mutação. No entanto, poder-se-ia supor que foram essas as causas responsáveis pela instabilidade observada no presente trabalho.

Deve-se levar também em consideração nessa discussão a segunda causa aventada para o aumento da instabilidade, ou seja, o da existência de material genético adicional em uma célula. Casos de aumento de instabilidade em organismos superiores e microrganismos que apresentam DNA extra tais como duplicações cromossômicas ou mesmo cromossomos em excesso já foram descritos na literatura. Os casos mais bem estudados são os que ocorrem em híbridos de *Nicotiana* (BURNS e GERSTEL, 1967), milho (Mc CLINTOCK, 1951), *Drosophila* (GREEN, 1967; 1969; 1973), mamíferos (HUGHES e AUSTIN, 1966), *Neurospora* (TURNER, 1975; 1977; NEWMAYER e GALEAZZI, 1977) e *Aspergillus* (NGA e ROPER, 1968; AZEVEDO e ROPER, 1970). Em muitos desses casos, exemplos de transposição de material genético foram encontrados. Até há pouco, não se podia determinar o que causava esse aumento de instabilidade nesses casos po-

rêm, recentemente o problema foi atacado do ponto de vista molecular e descobriu-se que, segmentos de inserção e transposons tem a capacidade de se deslocar, inserindo-se ou saindo dos cromossomos no caso de bactérias. Essas inserções e retiradas podem causar mutações pois ocasionam deleções ou mesmo ativação de certos genes, antes inativos. Esse é um campo novo e extremamente interessante da genética pois, o mecanismo de entrada e saída desses elementos transponíveis é diferente do da recombinação normal, razão pela qual o processo foi denominado de "recombinação ilegítima". É possível no entanto, que essa recombinação ilegítima seja mais importante do que se imagina e abrirá novos conceitos para estudos em Genética e Desenvolvimento.

Algumas tentativas de se comparar os dados obtidos em milho (*McCLINTOCK, 1951*) e os encontrados em microrganismos já foram efetuadas (*AZEVEDO e ROPER, 1970; AZEVEDO, 1971; NEVES e SAEDLER, 1977; MENEZES e AZEVEDO, 1978*) e isso poderá levar no futuro à generalizações importantes na área.

No presente trabalho, mais um caso de instabilidade foi observado e esse aumento ocorreu em linhagens com DNA adicional (plasmídio). Se esse plasmídio conter elementos transponíveis (segmentos de inserção) que possam inibir ou desencadear a função gênica quando inserida no cromossomo, isso explicaria os resultados aqui obtidos, ou seja, aumento na frequência de mutantes resistentes a estreptomicina.

7. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- a) O plasmídeo R tem influência na instabilidade em *Escherichia coli*. Houve um aumento na frequência de reversão espontânea de auxotrofia para prototrofia assim como na frequência de mutação para resistência à estreptomicina na linhagem portadora de plasmídeo.
- b) Com as devidas precauções, a atebrina (quinacrina) diminui a frequência de reversão e mutação para Str^R tanto na linhagem *E. coli* J_5^{Nx} (sem plasmídeo) como na linhagem *E. coli* J_5^{Nx} 99 (com plasmídeo).
- c) Esses dados, se confirmados para outros plas

mídios e outras espécies bacterianas terão grande importância clínica na emergência de mutantes resistentes em linhagens bacterianas, portadoras de elementos extracromossômicos.

8. SUMMARY

The present work serves the purpose to find out the influence of the plasmid R in the mutation frequency in *Escherichia coli*, confronting the frequency of spontaneous reversion from auxotrophie to prototrophie between plasmid-bearing strain (*E. coli* J₅^{Nx} 99) and strain which is not plasmid-bearing (*E. coli* J₅^{Nx}). The influence of plasmid in the emergence of mutants resistant to streptomycin as well as the valuation of the antimutagenic effect of atebrine (quinacrine) in the frequency of reversion and mutation, were also evaluated in these two strains.

It was found that the plasmid-bearing strain showed an increase in the spontaneous reversion frequency to methionine in a range from 1.29 to 54.33 times and from 2.22 to 11.56 to proline. The presence of this plasmid significantly increased the number of mutations to the resistance to streptomycin. This rise happened in a range from 99.03 to 343.4 times bigger, when compared to the strain

without plasmid. This datum can be of great importance due to the clinical problems that it brings about.

When the totality of experiments is considered, a slight decrease was detected, as far as the influence of atebrine in the frequency of reversion to prototrophic and resistance to streptomycin is concerned.

However, for definite conclusions, a greater number of data would be necessary.

9. LITERATURA CITADA

ALDERSON, T., 1966. Unstable genes in *Drosophila*. *Heredity*, 21:528.

ALMEIDA, L.M., 1976. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e sua instabilidade. Piracicaba, ESALQ/USP, 122p. (Tese de Mestrado).

ANDERSON, E.S. e N. DATTA, 1965. Resistance to penicilins and its transfer in Enterobacteriaceae. *Lancet*, 1:407-409.

AZEVEDO, J.L., 1971. Mitotic non conformity in *Aspergillus nidulans*. England, University of Sheffield. 240 p. (Ph.D. Thesis).

AZEVEDO, J.L., 1975. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 26:55-61.

AZEVEDO, J.L. e R.N. NEDER, 1963. Manual de Genética de Bactérias. Piracicaba, ESALQ/USP, 81p. (Publicação Didática).

- AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non conformity in *Aspergillus*: sucessive and transposable genetic changes. *Genetical Research* (Cambridge), 16:79-93.
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANTANA e R. BONATELLI JR., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:163-172.
- BABUDRI, N. e C. MONTI-BRAGADIN, 1977. Restoration of mutability in non-mutable *Escherichia coli* carrying different plasmids. *Molecular General Genetics*, 155:287-290.
- BACH, M.K. e H.G. JOHNSON, 1971. Some studies on the antimutagenic action of polyamines. *Progress in Molecular & Subcellular Biology*, 2:329-345.
- BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42:417-424.
- BALL, C., 1967. Chromosome instability related to gene supression in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* (Cambridge), 10:173-183.
- BALL, C. e J.A. AZEVEDO, 1976. Genetic instability in parasexual fungi. In: 2nd International Symposium on the genetics of Industrial Microorganisms. New York, Academic Press, 243-251.
- BARNETT, W.E. e F.J. DeSERRES, 1963. Fixed genetic instability in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 48:717-723.

- BERG, P., H. FANCHER e M. CHAMBERLIN, 1963. The syntesis of mixed polynucleotides containing ribo - and deoxyribonucleotides by purified preparations of DNA polymerase from *Escherichia coli*, In: VOGEL, H.J., V. BRYSON e J.O. LAMPEN (ed.), *Informational Macromolecules*. New York, Academic Press, p.467-483.
- BÖHME, H., 1967. Genetic instability of an ultraviolet sensitive mutant of *Proteus mirabilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28:191-196.
- BOLLON, A.P., 1975. Gene duplication and fusion genesis of the IVL-1 multi functional gene in *S. cerevisiae*. *Genetics*, 80 (3 part 1).
- BOUANCHAUD, D.H., M.R. SCAVIZZI e Y.A. CHABBERT, 1969. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in *Enterobactēria* and *Staphylococci*. *Journal of General Microbiology*, 54:417-425.
- BRESLER, S., M. MOSEVITSKY e L. VYACHESLAVOU, 1970. Complete mutagenesis in bacterial population induced by thymine starvation on solid media. *Nature* (London), 225:764-766.
- BRIDGES, B.A., R.E. DENNIS, R.J. MUNSON e M.A. ROTHWELL, 1971. A mutational instability associated with an ochre suppressor in *Escherichia coli*. *Heredity*, 27:485-486.
- BURNS, J.A. e D.V. GERSTEL, 1967. Flower color variegation and instability of a black of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, 57:155-167.
- BURR, K.W., H.M. PALMER e J.A. RÖPER, 1971. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effect of reduced DNA repair. *Heredity*, 27:487.

- BUTTIN, G., F. JACOB e J. MONOD, 1960. Syntese constitutive de galactokinase consêcutive au dêveloppement du bactêriophage λ chez *Escherichia coli* K₁₂. Compt Rend . Academic Science (Paris), 250:2471-2473.
- CAMPBELL, D.A., S. FOGEL e K. LUSNAK, 1975. Mitotic chromosome loss in a disomic haploid of *S. cerevisiae*. *Genetics*, 79:383-396.
- CAMPOS de, C.E.O.P., J.L. AZEVEDO e S.O.P. COSTA, 1976. Aspectos genêticos e clínicos da resistênci**a** bacteriana a drogas. *Ars CVRANDI*, 9:16-36.
- CASE, B.L. e J.A. ROPER, 1975. Genetic imbalance and mitotic nonconformity in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:8-11.
- CHABBERT, Y.A., J.G. BAUDENS e G.R. GERBAUD, 1964. Variations sons l'influence de l'acriflavine et transduction de la resistance à la kanamycine e au chloramphenicol chez les *Staphylococques*. *Annales de L'Institut Pasteur*, 107:679-690.
- CHARTONE-SOOUZA, E., 1975. Resistênci**a** a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, ICB/UFMG. 19 p. (Tese de Mestrado).
- CLARKE, C.H. e D.M. SHANKEL, 1975. Antimutagenesis in Microbial Systems. *Bacteriological Reviews*, 39:33-53.
- COHEN, S.N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* (London), 263:731-738.
- COHEN, S.N. e H.D. BARNER, 1954. Studies on unbalanced growth in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40:885-893.

- COHEN, S.N. e D.J. KOPECKO, 1976. Structural evolution of bacterial plasmids role of translocating genetic elements and DNA sequence insertions. *Federation Proceedings*, 35:2031-2036.
- COSTA, M.L.P., 1978. Eliminação da resistência extracromossômica a drogas em *Staphylococcus aureus*, pela ação do cloridrato de guanidina. São Paulo, IB/USP. 64 pags. (Tese de Mestrado).
- COSTA, S.O.P., 1974. Resistência microbiana a drogas e sua importância clínica. *O Médico Moderno* (Edição especial). p.6.
- COUGHLIN, C.A. e E.A. ADELBERG, 1956. Bacterial mutation induced by thymine starvation. *Nature* (London), 178:531-532.
- COX, C.E., 1973. Mutator gene studies in *Escherichia coli*: The Mut T gene. *Genetics supplement*, 73:67-80.
- COX, E.C. e C. YANOFSKY, 1969. Mutator gene studies in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 100:390-397.
- DARLINGTON, O., 1966. Instabilities in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18:1-20.
- DATTA, N. e P. KONTOMICHALOU, 1965. Penicillinase synthesis controlled by infections R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208:239-241.
- DAWSON, G.W.P. e P.F. SMITH-KEARY, 1963. Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18:1-20.

- DeCOURCY JR, S.L., 1971. Antimutagens and antimicrobial drug resistance. *Progress in Molecular & Subcellular Biology*, 2:316-328.
- DeCOURCY JR., S.J. e M.G. SEVAG, 1967. Population dynamics and results of fluctuation tests in a study of the role of atabrine as an antimutagen in preveniting streptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics Agents and Chemotherapy*, 1966:235-244.
- DEMERECE, M., 1941. Unstable genes in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9:145-167.
- DEMERECE, M., 1946. Induced mutations and possible mechanism of transmission of heredity in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academic Sciences, U.S.A.*, 32:36-46.
- DEMERECE, M. e I. HANSEN, 1951. Mutagenic action of manganous chloride. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:215-228.
- DEMERECE, M. e E. CAHN, 1953. Studies of mutability in nutritionally deficient strains of *Escherichia coli*. I. Genetic analysis of five auxotrophic strains. *Journal of Bacteriology*, 65:27-36.
- DOOLITTLE, W.F., 1978. Genes in pieces: were they ever together? *Nature (London)*, 272:581-582.
- DRABBLE, W.T. e B.A.D. STOCKER, 1968. R (transmissible drug-resistance) factors in *Salmonella typhimurium*: pattern of transduction by phage P₂₂ and ultraviolet protection effect. *Journal of General Microbiology*, 53:109-123.

DRAKE, J.W. e E.F. ALLEN, 1968. Antimutagenic DNA polimerases of bacteriophage T₄. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 33:339-344.

DRAKE, J.W., E.F. ALLEN, S.A. FORSBERG, R.M. PREPARATA e E.O. GREENING, 1969. Spontaneous mutation: genetic control of mutation rates in bacteriophage T₄. *Nature* (London), 221:1128-1132.

EMERSON, R.A., 1914. The inheritance of a recurring variation in variegated ears of maize. *American Naturalist*, 48:87-115.

EMERSON, R.A., 1917. Genetical studies on variegated pericarp in maize. *Genetics*, 2:1-35.

ESHLEMAN, J.L., M.R. HORWITZ, S.J. DeCOURCY, S. MUDD e W.S. BLAKEMORE, 1970. Atabrine as an adjuvant in the chemotherapy of urinary tract infections. *Journal of Urology*, 104:902-907.

FINCHAM, J.R.S. e G.R.K. SASTRY, 1974. Controlling elements in maize. *Annual Review of Genetics*, 8:15-50.

FRIGO, S.M. e J.L. AZEVEDO, 1975. Influência do plasmídeo R na frequência de mutação em *Escherichia coli*. *Ciência e Cultura*, (Suplemento), 27:228.

GABRIELLI, A.C., 1978. Estudos citogenéticos em uma linhagem deteriorada (V₈) de *Aspergillus nidulans* e seus derivados. Piracicaba, ESALQ/USP, 101p. (Tese de Mestrado).

GAVAZZI, G., M. SANDRI, G. ANZANI e A. GHIDONI, 1977. Chromosomal instability associated with duplications in maize. *Heredity*, 38:349-358.

- GOLDSTEIN, A. e J.S. SMOOT, 1955. A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *Journal of Bacteriology*, 70:588-595.
- GREEN, M.M., 1967. The genetics of a mutable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 56:467-482.
- GREEN, M.M., 1969. Controlling elements mediated transpositions of the white genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 61:429-441.
- GREEN, M.M., 1973. Some observations and comments on mutable and mutator genes in *Drosophila*. *Genetics* (supplement), 73:187-194.
- GREEN, M.M., 1975. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*. Mutable miniature (m^u). *Mutation Research*, 29:77.
- GREENBLATT, I.M., 1968. The mechanism of modulator transposition in maize. *Genetics*, 58:585-597.
- GRINSTED, J., J.R. SAUNDERS, L.C. INGRAM, R.B. SKYES e M.H. RICHMOND, 1972. Properties of an R-factors which originated in *Pseudomonas aeruginosa* 1822. *Journal of Bacteriology*, 110:529-537.
- GROSS, J.D., D. KARAMATA e P.G. HEMPSTEAD, 1968. Temperature-sensitive mutants of *B. subtilis* defective in DNA synthesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 33:307-312.

- GUNDERSEN, W.B., K. JYSSUM e S. LIE, 1962. Genetic instability with episome-mediated transfer in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 83:616-623.
- HABER, J.E., 1974. Bisexual mating behavior in a diploid of *S. cerevisiae* evidence for genetically controlled non-random chromosome loss during vegetative growth. *Genetics*, 78:843-858.
- HAHN, F.E., 1976. Antimutagens and the prevention of chromosomal mutations to drug resistance. *Antibiotics and Chemotherapy*, 20:112-132.
- HALL, Z.W. e I.R. LEHMAN, 1968. An "in vitro" transversion by a mutationally altered T₄ induced DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 36:321-333.
- HANAWALT, P.C. e R.H. HAYNES, 1965. Repair replication of DNA in bacteria: irrelevance of chemical nature of base defect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19:462-467.
- HANSCHKE, P.E., V. BERES e P. LANGE, 1978. Gene duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 88:673-687.
- HARRISON, B.J., 1971. Association of three highly mutable genes in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, 19:237.
- HARRISON, B.J. e R. CARPENTER, 1977. Somatic crossing-over in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, 38:169-189.
- HELINSKY, D.R., 1976. Plasmids. *Federation Proceedings*, 35:2024-2025.

- HIROTA, Y., 1960. The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 46:57-
- HOWARTH, S., 1965. Resistance to the bactericidal effect of ultraviolet radiation conferred on enterobacteria by the colicine factor col. I. *Journal of General Microbiology*, 40:43-55.
- HOWARTH, S., 1966. Increase in frequency of ultraviolet-induced mutation brought about by the colicine factor, col I. in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 3:129-134.
- HOZUMI, N. e S. TONEGAWA, 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A., 73:3628-3632.
- HUGHES, D.T. e S. AUSTIN, 1966. Karyotype instability in the syrian hamster "in vivo" and "in vitro". *Heredity*, 21:531-532.
- JACOB, F. e E.L. WOLLMAN, 1961. Sexuality and the genetics of bacteria. New York, Academic Press.
- JYSSUM, K., 1968. Mutator factor in *Neisseria meningitidis* associated with increased sensitivity to ultraviolet light and defective transformation. *Journal of Bacteriology*, 95:165-172.
- KINGSMAN, A.J., D.A. SMITH e M.D. HULANICKA, 1978. Genetic instability of auxotrophs of *Salmonella typhimurium* requiring cysteine or methionine and resistant to inhibition by 1, 2, 4 - triazole. *Genetics*, 89:419-437.

KIRCHNER, C.E.J., 1960. The effects of the mutator gene on molecular change and mutation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology*, 2:331-338.

1961

~~1961~~ KIRCHNER, C.E.J. e M.J. RUDDEN, 1966. Location of mutator gene in *Salmonella typhimurium* by cotransduction. *Journal of Bacteriology*, 92:1453-1456.

KREY, A.K. e F.E. HAHN, 1974. Optical studies on the interation of DL-quinacrine with double-and single-stranded calf thymus deoxyribonucleic acid. *Molecular Pharmacology*, 10:686-695.

KRISHNAPILLAI, V., 1975. Resistance to ultraviolet light and enhanced mutagenesis conferred by *Pseudomonas aeruginosa* plasmids. *Mutation Research*, 29:363-372.

KRONISH, J.W. e G.C. WALKER, 1979. The effects of the ultraviolet-protecting plasmids pKM-101 and R 205 on DNA polymerase I activity in *Escherichia coli* K₁₂. *Mutation Research* 60:135-142.

LATEN, H.M., J. GORMAN, F. WEBB e R.M. BOCK, 1976. Genetic analysis of a transposable supressor genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 73:4623-4627.

LEDERBERG, J. e E.L. TATUM, 1946. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 112:315-326.

LEHRBACH, P. A.H.C. KUNG e B.T.O. LEE, 1977. Loss of ultraviolet light protection and enhanced ultraviolet light-induced mutability in *Pseudomonas aeruginosa* carrying mutant R plasmids. *Journal of General Microbiology*, 101:135-141.

- LERMAN, L.S., 1963. The structure of the DNA-acridine complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 49:94-102.
- LURIA, S.E., 1962. Bacteriophage genes and bacterial functions. *Science*, 136:685-692.
- LURIA, S.E., M. DELBRUCK, 1943. Mutations from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28:481-511.
- MacPHEE, D.G., 1972. Effect of an R factor on resistance of *Salmonella typhimurium* to radiation and chemical treatment. *Mutation Research*, 14:450-453.
- MacPHEE, D.G., 1973a. Effect of *rec* mutation of the U.V. protecting and mutation enhancing properties of the plasmid R. Utrecht in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 19:357-359.
- MacPHEE, D.G., 1973b. Effects of an R factor and caffeine on ultraviolet mutability in *Salmonella Typhimurium*. *Mutation Research*, 18:367-370.
- McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:13-47.
- McCLINTOCK, B., 1953. Introduction of instability at selected loci in maize. *Genetics* (Princeton), 38:579-599.
- McCLINTOCK, B., 1955. Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symposia Biology*, 8:58-71.

McCLINTOCK, B., 1965. The control of gene action in maize.
In: "Genetic control of differentiation". *Brookhaven
Symposia in Biology*, 18:162-184.

MENEZES, E.M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados
e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam)
Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 114p. (Tese de Mestrado).

MENEZES, E.M. e J.L. AZEVEDO, 1978. Reversion in variants
from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*.
Molecular General Genetics, 164:255-258.

MIYATAKE, T., 1960. Mutator factor in *Salmonella*
typhimurium. *Genetics*, 45:11-14.

MOHN, G. e R.W. KAPLAN, 1967. Beeinflussung der spontanen
und chemisch induzierten mutabilität bei *Escherichia*
coli durch anderung des genetischen hintergrundes.
Molecular General Genetics, 99:191-202.

MORTELMANS, K.E. e B.A.D. STOCKER, 1974. Effects of an R
factor on susceptibility to the bactericidal action of
ultraviolet irradiation and on rates of
ultraviolet-induced and spontaneous mutation in
Salmonella typhimurium. *Microbial Genetics Bulletin*
(OHIO), 36:25-27.

- MORTELMANS, K.E. e B.A.D. STOCKER, 1976. Ultraviolet protection enhancement of U.V. mutagenesis and mutator effect of plasmid R₄₆ in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 128:271-282.
- MORTELMANS, K.E. e B.A.D. STOCKER, 1979. Segregation of the mutator property of plasmid R₄₆ from its ultraviolet-protecting property. *Molecular General Genetics*, 167:317-327.
- MUZYCZKA, N., P.L. POLAND e M.J. BESSMAN, 1972. Studies on biochemical basis of spontaneous mutation. I. A comparason of the deoxyribonucleic acid polymerases of mutator, antimutator, and wild type strains of bacteriophage T₄. *The Journal of Biological Chemistry*, 247:7116-7122.
- NEVERS, P. e SAEDLER, H., 1977. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature* (London), 268:109-115.
- NEWMEYER, D., 1965. Somatic instability in *Neurospora* resulting from a pericentric inversion. *Genetics*, 52:462-463.
- NEWMEYER, D. e C.W. TAYLOR, 1967. A pericentric inversion in *Neurospora* with a instable duplication progeny. *Genetics*, 56:771-791.
- NEWMEYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1977. The instability of *Neurospora* duplications Dp (IL - IR) H₄₂₅₀, and its genetic control. *Genetics*, 85:461-488.
- NEWMEYER, D. e D.R. GALEAZZI, 1978. A meiotic UV-sensitive mutants which causes deletion of duplications in *Neurospora*. *Genetics*, 89:245-269.

- NEWMAYER, D., A.L. SCHROEDER e D.R. GALEAZZI, 1978. An apparent connection between histidine, recombination, and repair in *Neurospora*. *Genetics*, 89:271-279.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1968. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 53:103-209.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* (Cambridge), 14:63-70.
- NIEFFINEGGER-SOUSA, D.R., 1979. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 244p. (Tese de Mestrado).
- NOVICK, A. e L. SZILARD, 1952. Anti-mutagens. *Nature* (London), 170:926-927.
- OKAMOTO, S. e Y. SUZUKI, 1965. Chloramphenicol, dehydrostreptomycin, and kanamycin-inactivating enzymes from multiple drug-resistance *Escherichia coli* carrying episome "R". *Nature*, 208:1301-1303.
- OLIVEIRA, F.M., 1980. Padrão de transmissão e expressão de marcadores de resistência a drogas em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, ICB/UFGM. (Tese de Mestrado, no prelo).
- ORGEL, A. e L.E. ORGEL, 1965. Induction of mutations of bacteriophage T₄ with divalent manganese. *Journal Molecular Biology*, 14:453-457.

PIZZIRANI, A.A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 111p. (Tese de Mestrado).

PETERSON, P.A., 1970a. Controlling elements and mutable loci in maize. Their relationship to bacterial episomes. *Genética*, 41:33-56.

PETERSON, P.A. 1970b. The *En* mutable system in maize. III. Transpositions associated with mutational events. *Theoretical and Applied Genetics*, 40:367-377.

PETERSON, P.A., 1976. Change in state following transposition of a regulatory element of enhancer system in maize. *Genetics*, 81:469-483.

POLLOCK, M.R., 1960. Drug resistance and mechanisms for its development. *British Medical Bulletin*, 16:16-22.

RAY, U., 1979. Study of a supressor of *mut T* of *Escherichia coli*. *Molecular General Genetics*, 171:215-218.

REANNEY, D., 1976. Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bacteriological Review*, 40:552-590.

RETHORÉ, M.O., B. DUTRILLAUX, J.C. JACOB e J. LEJEUNE, 1974. Trisome 4p par aneusomie de recombinaison d'une inv (4) (p14 q35). *Apud* PERKINS, D.D. e E. BARRY, 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Advances in Genetics*, 19:133-285.

RHOADES, M., 1941. The genetical control of mutability in maize. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9:138-144.

- RICHMOND, M.H., 1965. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*, *Biochemical Journal*, 94:584-593.
- RIYASATY, S., 1966. Instability and selective mutations in the aromatic genes of *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 21:528.
- ROPER, J.A., H.M. PALMER e W.A. WATMOUGH, 1972. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: the effect of caffeine. *Molecular General Genetics*, 118:125-133.
- ASTRY, G.R.K., 1976. Evocation of instability at the *pal* locus in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, 36:315-329.
- SEVAG, M.G., 1964. Prevention of the emergence of antibiotic-resistant strains of bacteria by atebrine. *Archives of Biochemical and Biophysical*, 108:85-88.
- SEVAG, M.G. e W.T. DRABLE, 1962. Prevention of the emergence of drug-resistant bacteria by polyamines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 8:446-452.
- SEVAG, M.G., e B. ASHTON, 1964. Evolution and prevention of drug-resistance. *Nature* (London), 203:1323-1326.
- SHARDA, D.C., D. CORNFELD e A. MICHIE. 1966. Effect of mecaprine (atebrin) on the sucess of antibacterial treatment of urinary infections. *Archives of Disease in Childhood*, 41:400-401.
- SHAW, W. e R.F. BRODSKY, 1968. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 95:28-36.

- SICCARDI, A.G., 1969. Effects of R factors and others plasmids on ultraviolet susceptibility and host cell reactivation property of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 100:337-346.
- SIQUEIRA JR., J.P., J.L. AZEVEDO, 1978. Efeito do brometo de etídio em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a drogas. *Revista de Microbiologia*, 9:137-141.
- SIQUEIRA JR., J.P., FRIGO, S.M., E. CHARTONE-SOUZA e J.L. AZEVEDO, 1975. Eliminação de resistência a drogas em *Escherichia coli* pelo brometo de etídio. VI Congresso Brasileiro de Microbiologia. *Resumo dos Trabalhos*. p.80.
- SMITH, D.H., 1967. R factors mediate resistance to mercury nickel and cobalt. *Science*, 156:1114-1116.
- SMITH, J.T., 1969. R factor gene expression in gram-negative bacteria. *Journal of General Microbiology*, 55:109-120.
- SMITH, D.H. e B.D. DAVIS, 1967. Mode of action of novobiocin in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93:71-79.
- SPEYER, J.F., 1965. Mutagenic DNA polymerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 21:6-8.
- STANIER, R.Y., M. DOUDOROFF e E.A. ADELBERG, 1969. Crescimento e morte de bactérias. In: *O mundo dos micróbios*. S.P., Edgard Blucher, cap.15, p.310-333.
- SZYBALSKY, W., 1952. Microbiol selection. I- Gradient plate technique for study of bacterial resistance. *Science*, 116:46-48.

- TRABULSI, L.R., 1973. Aspectos médicos da resistência bacteriana à drogas. *Revista de Microbiologia* (Suplemento especial), 30 pags.
- TRABULSI, L.R., 1975. Resistência microbiana a drogas. In: Antibióticos. Antonio Carlos da Silva Lacaz., coordenador. 3a. ed. São Paulo. Edgard Blucher, Ed. da USP. 254p.
- TREFFERS, H.P., V. SPINELLI e N.O. BELSER, 1954. A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* U.S.A., 40:1064-1071.
- TOMOEDA, M., M. INUZUKA, N. KUBO e S. NAKAMURA, 1968. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Bacteriology*, 95:1078-1089.
- TURNER, B.C., 1975. Duplications in *Neurospora* produced meiotically by a translocation T (I - VI) NM 103, and their breakdown to produce euploid derivatives. *Genetics*, 80:81.
- TURNER, B.C., 1977. Euploid derivatives of duplications from a translocation in *Neurospora*. *Genetics*, 85:439-460.
- UMEZAWA, H., M. OKANISHI, R. UTAHARA, K. MAEDA e S. KONDO, 1967. Isolation and structure of kanamycin inactivated by a cell-free system of kanamycin-resistant *E. coli*. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) Ser.A., 20:136-141.
- YANOFSKY, C., E.C. COX e V. HORN, 1966. The unusual mutagenic specificity of an *E. coli* mutator gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, U.S.A., 55:274-281.

- YARMOLINSKY, M.B., E. JORDAN e H. WIESMEYER, 1961. Regulatory mechanisms in the synthesis of enzymes of galactose metabolism. Part I- Coordinate repression and de-repression of the "Galactose Sequence". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 26:217-226.
- WALKER, G.C., 1977. Plasmid (pKM-101) mediated enhancement of repair and mutagenesis dependence on chromosomal genes in *Escherichia coli* K₁₂. *Molecular General Genetics*, 152:93-103.
- WATANABE, T., 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological Review*, 27:87-115.
- WEBB, R.B., H.E. KUBITSCHKE, 1963. Mutagenic and antimutagenic effects of acridine orange in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13:90-94.
- WEINBERG, R. e A.B. LATHAN, 1956. Apparent mutagenic effect of thymine deficiency for a thymine-requiring strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 72:570-572.
- ZUCCHI, T.M.A., 1975. Instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Ribeirão Preto, S.P. Faculdade de Medicina. 96 p. (Tese de Doutorado).