

**INFLUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES *UVRA*, *RECJ*, Y *RECN*
SOBRE LA RESTAURACIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR EN CÉLULAS DE
ESCHERICHIA COLI TRATADAS CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA**

CARLOS FELIPE ESTÉVEZ CASTRO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2017

**INFLUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES *UVRA*, *RECJ*, Y *RECN*
SOBRE LA RESTAURACIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR EN CÉLULAS DE
ESCHERICHIA COLI TRATADAS CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA**

CARLOS FELIPE ESTÉVEZ CASTRO

**Trabajo de Investigación para optar al título de
Biólogo**

Director

**JORGE LUIS FUENTES LORENZO, MICROBIÓLOGO, Ph. D. EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

Co-Director

**JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO, BIÓLOGO, Ph. D. EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2017

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS	15
1.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. MATERIALES Y METODOS	16
2.1 COMPUESTOS QUÍMICOS	16
2.2 ESTIRPES CELULARES	16
2.3 CONDICIONES DE CULTIVO	17
2.4 CONDICIONES DE IRRADIACIÓN	17
2.5 ESTABLECIMIENTO DE UNA TINCIÓN FLUORESCENTE DEL NUCLEOIDE BACTERIANO	18
2.6 CATEGORIZACIÓN CELULAR CON BASE EN LA FORMA DEL NUCLEOIDE	18
2.7 ESTUDIOS CINÉTICOS DE LAS FASES DEL NUCLEOIDE BACTERIANO	19
2.8 INFLUENCIA DE CO-TRATAMIENTOS (UVB + COMPUESTOS) SOBRE EL CICLO CELULAR BACTERIANO	19
2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1 ESTABLECIMIENTO DE LA TINCIÓN FLUORESCENTE	21
3.2 MORFOTIPOS DEL NUCLEOIDE EN ESTIRPES CELULARES DE E. COLI EN FASE EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO	24
3.3 DINÁMICA POST-IRRADIACIÓN DEL NUCLEOIDE DE E. COLI	27
3.4 RELACIÓN ENTRE LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS FILAMENTOSAS POST-IRRADIACIÓN Y EL MORFOTIPO EXTENDIDO DEL NUCLEOIDE	30
3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO MODULADOR DEL MORFOTIPO DEL NUCLEOIDE BACTERIANO POR COMPUESTOS NATURALES QUE INHIBEN LA RESPUESTA SOS	35
4. CONCLUSIONES	41
5. RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema básico del proceso de división celular en <i>E. coli</i> .	12
Figura 2. Esquema general del protocolo de tinción fluorescente modificado.	22
Figura 3. Arriba: Morfotipos del nucleoide de <i>E. coli</i> . Se presentan de izquierda a derecha los morfotipos bilobulado, compactado y extendido. Abajo: Célula filamentosa de longitud $\geq 4.4 \mu\text{m}$ según lo indicado por Volkmer & Heinemann (2011).	23
Figura 4. Comportamiento del error estándar de los valores medios de frecuencias de morfotipos del nucleoide en la cepa <i>E. coli</i> PQ30. Cada punto representado por morfotipo, corresponde al número de campos ópticos leídos; por tanto, los valores medios de frecuencias presentados fueron calculados con base al número de células presentes por campos ópticos. La línea puntuada representa el campo óptico 21.	24
Figura 5. Ciclo celular de <i>E. coli</i> bajo condiciones de crecimiento exponencial. Arriba, esquema construido según lo indicado por Fisher et al. (2013) y por Kleckner et al. (2014). Abajo, montaje fotográfico del ciclo de división celular usando el protocolo de tinción fluorescente descrito en la Figura 2.	25
Figura 6. Dinámica post-irradiación del nucleoide bacteriano en las estirpes celulares de <i>E. coli</i> PQ30 (silvestre), PQ37 (<i>uvrA</i>), IN400 (<i>recJ</i>) e IN250 (<i>recN</i>). Se presentan, los valores medios de frecuencias de morfotipos de nucleoide y sus correspondientes errores estándar ($n = 4$).	28
Figura 7. Dinámica pos-irradiación para el morfotipo extendido del nucleoide (a) y la filamentación celular (b), en las estirpes celulares de <i>E. coli</i> PQ30 (silvestre), PQ37 (<i>uvrA</i>), IN400 (<i>recJ</i>) y IN250 (<i>recN</i>). Se presentan, valores medios y sus correspondientes errores estándar, calculados a partir de cuatro (4) experimentos independientes.	31
Figura 8. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleoide bacteriano en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (<i>uvrA</i>) a los 120 min de incubación.	36
Figura 9. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleoide bacteriano post-irradiación en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (<i>uvrA</i>) a los 120 min de incubación.	37

Figura 10. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la filamentación de la estirpe celular PQ37 (*uvrA*) a los 120 min de incubación post-irradiación. 39

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estirpes celulares usadas en el estudio.	16
Tabla 2. Frecuencias de las diferentes morfotipos de nucleoide para las estirpes PQ30 (silvestre), PQ37 (<i>uvrA</i>), IN400 (<i>recJ</i>) e IN250 (<i>recN</i>), cultivadas bajo condiciones de crecimiento exponencial. Se presentan, los valores medios y sus correspondientes errores estándar calculados de cuatro (4) experimentos independientes.	25

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Análisis de la expresión de genes inducidos por la RUV en <i>Escherichia coli</i> mediante la técnica qRT-PCR.	50
Anexo B. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleoide bacteriano en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (<i>uvrA</i>) a los 60 min de incubación.	51
Anexo C. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleoide bacteriano post-irradiación en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (<i>uvrA</i>) a los 60 min de incubación	52

RESUMEN

TÍTULO: INFLUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES *UVRA*, *RECJ*, Y *REC�* SOBRE LA RESTAURACIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR EN CÉLULAS DE *ESCHERICHIA COLI* TRATADAS CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA*

AUTOR: CARLOS FELIPE ESTÉVEZ CASTRO**

PALABRAS CLAVE: *Escherichia coli*, nucleoide, división celular, microscopia fluorescente, Carvacrol, *p*-Cimeno, Pinocembrina, Apigenina, Resveratrol.

DESCRIPCIÓN: Cuando *Escherichia coli* es tratada con radiación ultravioleta, se detiene la replicación del ADN y división celular. La restauración de estos procesos, involucra cambios importantes de organización cromosómica que son dependientes de la proteína RecN. Recientemente, nuestro grupo mostró que cepas de *E. coli uvrA* y *recJ* son hipersensibles a la UVB. En el presente trabajo se evaluó la importancia de RecN, UvrA y RecJ sobre la restauración de la división celular post-irradiación. Asimismo, se evaluó el potencial efecto modulador de diferentes compuestos terpénicos y flavonoides sobre la organización del nucleoide post-irradiación. Para ello, usamos estirpes con mutaciones en los genes en cuestión y estudiamos sus cinéticas post-irradiativas de los morfotipos del nucleoide, mediante tinción fluorescente. A continuación, en tratamientos simples y con irradiación evaluamos la influencia de los diferentes compuestos sobre el nucleoide. En la cinética del genotipo salvaje primero incrementó el morfotipo compactado del nucleoide (15-30 min); luego el extendido (30-60 min), y finalmente, el bilobulado (60-120 min). Dicha dinámica fue modificada en las cepas *uvrA* y *recJ*; retardándose la compactación hasta los 45 y 60 min, respectivamente, para luego incrementarse el morfotipo extendido; morfotipo fielmente relacionado con el proceso de filamentación celular. Por su parte, la estirpe *rec�* no mostró incrementos del morfotipo compactada en toda su cinética post-irradiativa. En la segunda parte del estudio, evidenciamos diferencias en las frecuencias de los morfotipos del nucleoide de *E. coli* en los distintos tratamientos. En conclusión, la restauración de la división celular post-irradiación se caracteriza por una dinámica re-organizativa de compactación, des-compactación y restauración de la división. Dicha dinámica se vio modificada en cada mutante, demostrándose la importancia de *uvrA* y *recJ* en la restauración de la división celular y de *rec�* en la compactación del nucleoide. Finalmente, es evidenciado el efecto modulador del nucleoide de los compuestos evaluados.

*Proyecto de investigación.

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes-Lorenzo, Microbiólogo, Ph.D. Codirector: Jorge Humberto Serment-Guerrero, Biólogo, Ph.D

ABSTRACT

TITLE: INFLUENCE OF MUTATIONS IN THE *UVRA*, *RECJ* AND *REC�* GENES IN THE RESTORATION OF THE CELLULAR DIVISION IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS TREATED WITH ULTRAVIOLET RADIATION*

AUTHOR: CARLOS FELIPE ESTÉVEZ CASTRO**

KEY WORDS: *Escherichia coli*, nucleoid, cell division, fluorescence microscopy, Carvacrol, p-Cymene, Pinocembrin, Apigenin, Resveratrol.

DESCRIPTION: When *Escherichia coli* is treated with ultraviolet radiation, its DNA replication and cellular division stop. The restoration of these processes involves important modifications in the chromosome organization, which are dependent on the action of RecN protein. Recently our group showed that *uvrA* and *recJ* *E. coli* strains are hypersensitive to UVB rays. In the following project was evaluated the importance of RecN, UvrA and RecJ in the cell division restore after UV rays. Moreover, the potential modulating effect of different terpene compounds and flavonoids on the post-irradiation nucleoid organization was evaluated. In order to do this, we used strains with mutations in the questioned genes and studied their post-irradiation nucleoid kinetics, using an established fluorescent staining technique. Subsequently, in simple and irradiated treatments we evaluated the influence of the compounds on the nucleoid organization. In kinetics of the wild genotype, first the compacted nucleoid morphotype increased (15-30 min), then, the extended morphotype (30-60 min), and finally the bilobed morphotype (60-120 min). These dynamics were affected in the *uvrA* and *recJ* strains. They delayed the compaction to 45 and 60 min, respectively. Afterward, the extended morphotype increased; morphotype closely related to the cellular filamentation process. In contrast, the *recN* strain did not show increases in the compacted morphotype during its post-irradiation kinetics. In the second part of the study were observed differences in the morphotype frequencies of the *E. coli* nucleoid at the treatments. In conclusion, the post-UV cell division restore is characterized by a re-organizational dynamic of compaction, de-compaction and cell division restore. This dynamic was modified in the mutants evaluated, demonstrating the importance of *uvrA* and *recJ* in the cell division restore, and of *recN* in the compaction of the nucleoid. Finally, in this study was evidenced the modulating effect on the nucleoid of the evaluated compounds.

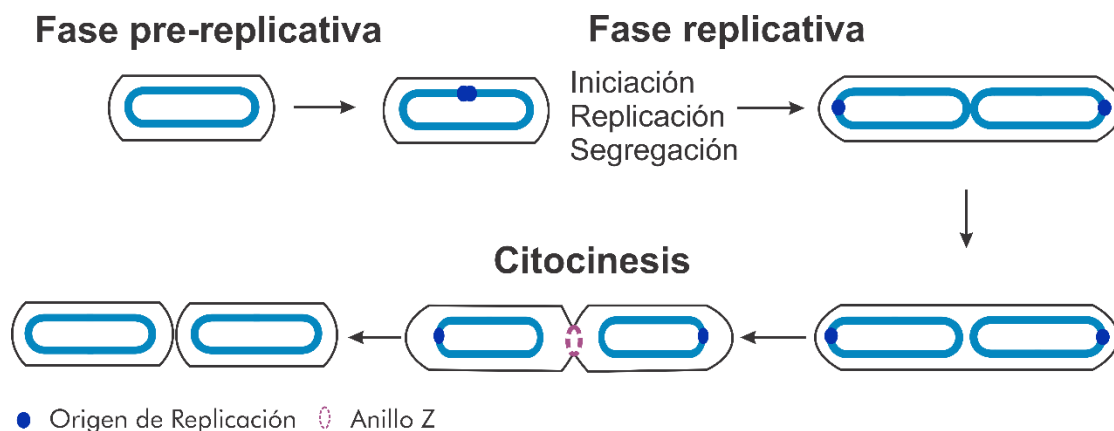
* Research work

** Science Faculty. Biology School. Director: Jorge Luis Fuentes-Lorenzo, Microbiologist, Ph.D. Codirector: Jorge Humberto Serment-Guerrero, Biologist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias constituyen unos de los modelos más efectivos para el estudio de los principios básicos de la organización y funcionamiento cromosómico (Kleckner et al. 2014) y de los mecanismos de reparación del daño genético (Rudolph et al. 2008). Bajo condiciones óptimas de división celular (fase exponencial de crecimiento), la célula de *Escherichia coli* muestra tres fases bien caracterizadas (Figura 1): i) una fase pre-replicativa donde el nucleoide posee forma elipsoidal en la que ocurren procesos que preparan el nucleoide para su replicación; ii) una fase replicativa donde ocurre la replicación y la segregación de los cromosomas hermanos; y iii) una fase final de citocinesis (Fisher et al. 2013; Kleckner et al. 2014). La replicación fiel y precisa del ADN durante la división celular, es fundamental para mantener la integridad y viabilidad de la célula través de generaciones.

Figura 1. Esquema básico del proceso de división celular en *E. coli*.



La radiación ultravioleta (UV) es un agente físico altamente genotóxico que produce lesiones en el ADN, principalmente del tipo dímeros de pirimidina cis-syn ciclobutano (CPD) y fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP) (Beehler et al. 1992; Mitchell et al. 2001). Si estas lesiones no son reparadas, pueden llevar a

la fijación de mutaciones y a la formación de re-arreglos cromosómicos; que afectan la estabilidad genómica (Kuzminov 1995). En el caso de las células humanas, si estas lesiones no son reparadas, pueden iniciar procesos tumorales (Van Laethem et al. 2005). Por consiguiente, todas las células de los organismos que habitan nuestro planeta poseen mecanismos como la reparación por escisión de nucleótidos (Sancar & Rupp 1983); el cual permite eliminar este tipo de lesiones y mantener la estabilidad del genoma. Dichos mecanismos, aunque estructuralmente diferentes, han sido funcionalmente conservados en todo el árbol de la vida (Aravind et al. 1999; Britt 1999; Eisen & Hanawalt 1999; Robertson et al. 2009).

En *E. coli*, la exposición a la UV bloquea la división celular y activa una respuesta celular conocida como respuesta SOS (Witkin 1976). Durante esta respuesta, son inducidos aproximadamente 40 genes diferencialmente regulados (Courcelle et al. 2001) que participan en diferentes funciones celulares como: reparación del ADN, inducción de filamentación celular, mutagénesis, restauración de la replicación del ADN, así como, inducción de proteínas de funciones desconocidas (Fogliano & Schendel 1981; Kenyon & Walker 1981; Bagg et al. 1981; Courcelle & Hanawalt 2001; Quillardet et al. 2003) La proteína LexA funciona como un represor común a todos los genes SOS, que se une a una secuencia de nucleótidos (caja SOS) presente en la región operadora de estos genes y limita su expresión (Little & Mount 1982; Lewis et al. 1994). La proteína RecA es un regulador positivo de la respuesta SOS y muestra alta afinidad por regiones de ADN de cadena sencilla; la cual sirve como una señal inicial para la inducción de la respuesta SOS (Higashitani et al. 1995).

Los CPD y 6-4PP producidos por UV son además un obstáculo para la replicación del cromosoma de *E. coli*. El complejo enzimático helicasa/nucleasa RecQ/RecJ y la recombinación vía RecA/RecFOR, se han identificado como mecanismos esenciales para restaurar la horquilla de replicación del ADN detenida en las lesiones (Courcelle & Hanawalt 1999; 2001; Courcelle et al. 1999; 2003; 2006; Chow

& Courcelle 2004). La exposición a UV además produce cambios importantes en cuanto al grado de organización y compactación cromosómica de *E. coli*; los cuales son dependiente de la proteína de mantenimiento estructural cromosómico RecN (Odsbu & Skarstad 2014). La proteína RecN se produce en grandes cantidades durante la fase inicial de inducción de la respuesta SOS (Courcelle et al. 2001; Khanin et al. 2006); y se cree, que esta proteína participa en la estabilización del ADN dañado para que ocurra la recombinación y reparación del daño genético (Odsbu & Skarstad 2014). Recientemente, nuestro grupo mostró que cepas isogénicas de *E. coli* con deficiencias en los genes *uvrA* y *recJ* son altamente sensibles a la UVB; mostrando altos y sostenidos niveles de inducción de la respuesta SOS después de 240 min pos-irradiación (Prada Medina et al. 2016). Dado que el conocimiento sobre los procesos de restauración de la división celular en células irradiadas con UV, es clave para el desarrollo de estrategias de fotoprotección; el presente proyecto pretende conocer la relevancia que tienen las proteínas RecN, UvrA y RecJ en los procesos de restauración de la división celular post-irradiación. Asimismo, y considerando la utilidad de esta información para el estudio de compuestos bio-antimutagénicos, se evaluó la influencia de diferentes compuestos naturales sobre las frecuencias post-irradiación de morfotipos del nucleóide de *E. coli*.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de las mutaciones en los genes *uvrA*, *recJ* y *recN* en el proceso de restauración de la división celular en células de *E. coli* tratadas con UVB mediante el estudio de las fases o morfotipos del nucleoide bacteriano.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar una técnica de tinción fluorescente para el estudio de las fases del nucleoide bacteriano durante la restauración de la división celular en células de *E. coli* tratadas con UVB

Evaluar el impacto de las mutaciones en los genes *uvrA*, *recJ* y *recN* en el proceso de restauración de la división celular en células de *E. coli* tratadas con UVB

Evaluar si el análisis de fases del nucleoide pos-irradiación es un modelo adecuado para esclarecer mecanismos de acción de compuestos naturales con potencial fotoprotector

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. COMPUESTOS QUÍMICOS

Los colorantes 4,6-diamino-2-fenil-indol (DAPI) y Eosina Y, la poli-L-lisina; así como, los compuestos de referencia Carvacrol (98% de pureza), *p*-Cimeno (99%), Pinocembrina (95%), Apigenina (95%) y Resveratrol (99%) se obtuvieron a través de la casa comercial Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Missouri, USA). Durante los bioensayos, los compuestos *p*-Cimeno y Apigenina fueron disueltos en metanol; mientras que, el Carvacrol, la Pinocembrina y el Resveratrol fueron disueltos en etanol. Todos los reactivos se almacenaron según indicaciones de la casa comercial, en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA).

2.2. ESTIRPES CELULARES

Todas las cepas que se usaron en el estudio son presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes celulares usadas en el estudio.

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Fuente
PQ30	<i>F-, thr, leu, his, pyrD, thi, trp::MuC+, srl300::Tn10, rpoB, lacΔU169, galE, galY, phoC, sulA::Mu d(Ap lacZ)cts</i>	Salvaje	(Quillardet & Hofnung 1985)
PQ37	Igual que PQ30 pero <i>uvrA</i>	Escinucleasa UvrABC deficiente para la actividad detectora del fotoproducto	(Quillardet & Hofnung 1985)
IN400	Igual que PQ30 pero <i>recJ284::Tn10</i>	Helicasa/nucleasa RecQ/RecJ deficiente para la actividad exonucleasa 5' → 3'	(Breña-Valle & Serment-Guerrero 1998)
IN250	Igual que PQ30 pero <i>tyrA::Tn10 recN</i>	Vía de recombinación RecFOR deficiente en la actividad detectora de las lesiones de doble cadena	(Breña-Valle & Serment-Guerrero 1998)

Detalles sobre el origen de cada una pueden encontrarse en los trabajos de Quillardet & Hofnung (1985) y Breña-Valle & Serment-Guerrero (1998). Durante todos los ensayos, la estirpe PQ30 fue considerada como el genotipo salvaje. Las estirpes IN400, IN250 y PQ37, contienen mutaciones en los genes *recJ*, *recN* y *uvrA*, respectivamente. Por tanto, IN400 no puede restaurar la horquilla de replicación, IN250 es deficiente para el reconocimiento de roturas de doble hebra en el ADN y PQ37 es deficiente para la reparación por escisión de nucleótidos.

2.3. CONDICIONES DE CULTIVO

Las diferentes cepas fueron almacenadas en glicerina a -80°C para su conservación. Los conservados fueron cultivados en medio líquido Luria-Bertani (Tryptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5 g /L, Cloruro de Sodio 10 g/L, pH 7.4) de la casa comercial (AMRESCO, USA); el cual fue suplementado con los antibióticos Tetraciclina (17 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubados a 37°C bajo condiciones de agitación permanente (170 rpm) durante 16 h. Al día siguiente, para la obtención de un cultivo en fase exponencial, se realizó una dilución 1 en 10 en medio fresco; el cual se dejó crecer en idénticas condiciones experimentales hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.4$).

2.4. CONDICIONES DE IRRADIACIÓN

En todos los casos, la irradiación se llevó a cabo en la oscuridad y se emplearon cultivos de células (3.2 mL) en fase exponencial $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.4$ ($\sim 2 \times 10^8$ células/mL). Dichos cultivos, fueron distribuidos en placas de Petri de 9 cm de diámetro con el fin de obtener una capa de cultivo fina y homogénea ($\sim 1,1$ mm). Las células se irradiaron con una dosis de $10 \text{ J}/\text{m}^2$ de UVB en una cámara de irradiación UVA (320–400 nm) / UVB (280–315nm) BS-02 (Dr. Grobel UV-Elektronik GmbH, Alemania); equipada con un controlador de radiación UV-MAT de la misma casa comercial.

2.5. ESTABLECIMIENTO DE UNA TINCIÓN FLUORESCENTE DEL NUCLEOIDE BACTERIANO

Se siguió básicamente el procedimiento descrito por Hiraga et al. (1989), con modificaciones. Así, con el fin de obtener una tinción de calidad con nucleoides definidos para el análisis de sus morfotipos, se evaluó la influencia de los siguientes factores: *i)* las condiciones de lavado celular, *ii)* las condiciones para la fijación celular (volumen del metanol y concentración de la poli-L-lisina), *iii)* el volumen y la concentración del fluorocromo (4',6-diamino-2-fenilindol, DAPI) y del colorante contraste (Eosina Y) y, *iv)* el efecto de la densidad celular en el conteo. Las imágenes fluorescentes de los nucleoides se obtuvieron usando un microscopio de Epi-fluorescencia Carl Zeiss Axio Scope A1 (Jena, Alemania) con un filtro de paso de banda estrecha Zeiss Fs 02 HE y con banda de excitación de $\lambda \approx 350\text{nm}$ y rango de emisión $\geq 420\text{nm}$. Las fotos fueron tomadas usando una cámara digital Zeiss Axio Cam ICm 1 (Jena, Alemania) conectada a un programa de análisis de imágenes (Zeiss ZEN 2012). Las imágenes se procesaron mediante el programa ImageJ (Schneider et al. 2012).

2.6 CATEGORIZACIÓN CELULAR CON BASE EN LA FORMA DEL NUCLEOIDE

Dependiendo de la forma o morfotipo de su nucleoide, las células se clasificaron en tres categorías: *i)* células con nucleoide extendido o en recuperación, *ii)* células con nucleoide bilobulado o en división y, *iii)* células con nucleoide compactado o arrestado. Se consideraron como células en recuperación aquellas que muestran el nucleoide extendido a lo largo de la célula; lo cual es indicativo de que se llevan a cabo procesos de reparación del daño genético, expresión génica, etc. En esta categoría, se pueden encontrar células de tamaño normal ($\approx 3 \mu\text{m}$ de longitud), y filamentosas ($\geq 4.4 \mu\text{m}$ de longitud), parámetro definido según Volkmer & Heinemann (2011); pero en todos los casos debe ser evidente la existencia del nucleoide. La segunda categoría muestra células en división con nucleoides bilobulados o con algún estado del proceso de segregación cromosómica. Se

entiende que estas células superaron el bloqueo o arresto celular producido por la exposición a la UV. Finalmente, fue considerada como célula arrestada aquella que muestra un nucleoide esférico y compactado en la región media de la célula y que no ocupe más de 1/3 del volumen celular. Por ello, se entiende que esta célula se prepara para reparar los daños producidos por la UV. Las células que no tiñeron su nucleoide fueron consideradas como células muertas y no se clasificaron en ninguna de las categorías anteriores.

2.7. ESTUDIOS CINÉTICOS DE LAS FASES DEL NUCLEOIDE BACTERIANO

Las células irradiadas fueron incubadas en la oscuridad bajo similares condiciones de cultivo durante diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 120 min). Finalizados cada uno de los tiempos fueron llevadas a frío (0 - 4°C) y posteriormente colectadas, fijadas sobre portaobjetos y teñidas de acuerdo al procedimiento estandarizado descrito en el acápite 3.1. Simultáneamente, y a los mismos tiempos indicados arriba, se hicieron mediciones del número de células filamentosas ($\geq 4.4 \mu\text{m}$ de longitud) con el fin de ver asociaciones entre fases del nucleoide y la filamentación celular pos-irradiación para cada estirpe bacteriana (Volkmer & Heinemann 2011). En todos los ensayos, se incluyó un control no irradiado (control negativo). Se desarrollaron al menos dos experimentos independientes con dos replicas o portaobjetos cada uno. Las frecuencias de las tres categorías celulares en los diferentes tiempos fueron determinadas contando al menos 500 células para cada portaobjetos. Las frecuencias de cada categoría fueron expresadas en porcentajes.

2.8 INFLUENCIA DE CO-TRATAMIENTOS (UVB + COMPUESTOS) SOBRE EL CICLO CELULAR BACTERIANO

Con el fin de conocer si diferentes compuestos terpenos y flavonoides pueden modular la cinética de las fases del nucleoide bacteriano pos-irradiación, las células en fase exponencial del crecimiento fueron expuestas a diferentes tratamientos

como sigue: *i*) células no tratadas (control negativo), *ii*) células tratadas con compuestos, *iii*) células co-tratadas (compuesto + 10 J/m² de UVB) y, *iv*) células irradiadas (10 J/m² de UVB). Se usaron aquellas concentraciones de compuestos que previamente mostraron efecto antígenotóxico frente a UVB en el SOS Chromotest (Fuentes et al., en preparación). Para permitir la incorporación de los compuestos en las células de los grupos *ii* y *iii*; posterior a la exposición, y a la exposición + irradiación, respectivamente; fueron llevadas las células a 4°C por 30 min. Finalmente, las células fueron incubadas en la oscuridad a 37°C con agitación (170 rpm) y se tomaron muestras a los 60 y 120 min. A continuación, las células fueron llevadas a frío y posteriormente colectadas, fijadas sobre portaobjetos y teñidas de acuerdo al procedimiento estandarizado descrito en el acápite 3.1.

2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los valores medios de los tratamientos de los estudios cinéticos (tiempos de recuperación pos-irradiación) para cada cepa mutante, se compararon con los de la cepa salvaje usando un test de Tukey en la plataforma R (R Core Team 2013). De igual manera, los valores medios de los tratamientos y co-tratamientos con compuestos fueron comparados con los controles no irradiados e irradiados, respectivamente, usando el mismo test. Los valores medios de los estudios cinéticos, tratamientos y co-tratamientos con compuestos fueron graficados usando el programa *ggplot2* de la plataforma R.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTABLECIMIENTO DE LA TINCIÓN FLUORESCENTE

Como indicamos en materiales y métodos, se evaluó la influencia de diferentes variables sobre la calidad del protocolo de tinción de nucleoides bacterianos desarrollado por Hiraga et al. (1989). Estos son: *i*) las condiciones de lavado celular, *ii*) las condiciones para la fijación celular (volumen del metanol y concentración de la poli-L-lisina), *iii*) el volumen y la concentración del fluorocromo (DAPI) y del colorante contraste (Eosina Y) usados en la tinción celular y, *iv*) el efecto de la densidad celular en el conteo. A continuación, se describen las condiciones óptimas obtenidas para cada una de las variables indicadas:

I) CONDICIONES DE LAVADO CELULAR: Se estableció que la realización de dos lavados de la muestra con solución salina (0,84% de NaCl), cada uno durante 10 min a 0°C y 10000 rpm en una microcentrífuga refrigerada 5424R (Eppendorf, Brasil), son suficientes para eliminar las impurezas que interfieren con la tinción.

II) FIJACIÓN CELULAR: Se ajustaron las condiciones de fijación celular inicial; así como, las cantidades y concentraciones de los reactivos fijadores. Por consiguiente, una muestra de células (12µL) es extendida en el portaobjetos y secada a 37°C. A continuación, la muestra es fijada aplicando sobre ella 5µL de metanol frío (< 4°C) dos veces. Cuando ya se encuentra seca la muestra es lavada con 10 µL de agua destilada estéril, secada a 37°C y, finalmente, cubierta con 10 µL de poli-L-lisina (500 µg/mL agua destilada).

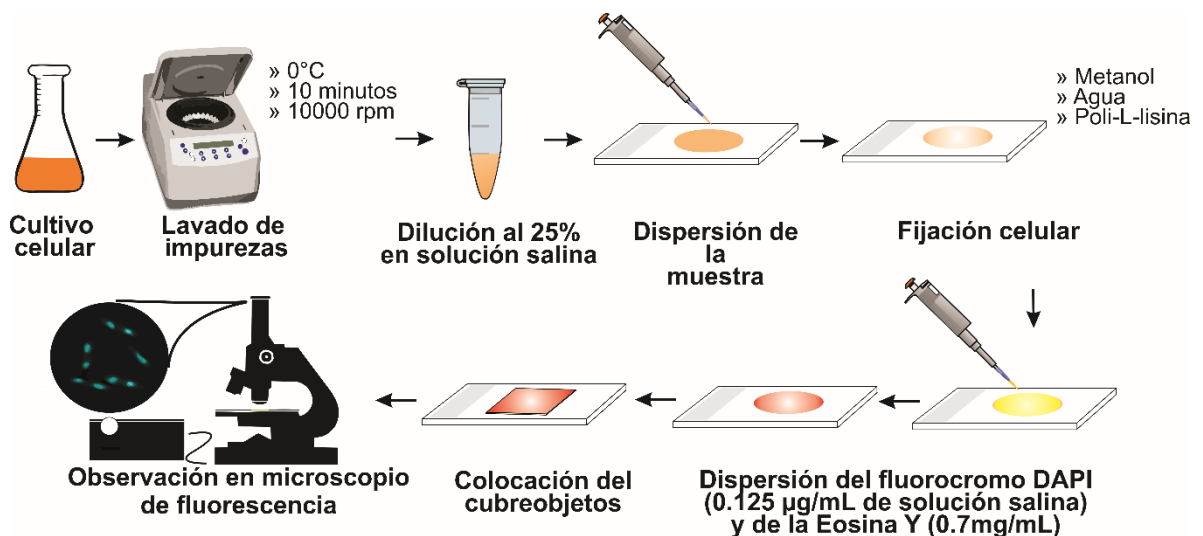
III) TINCIÓN CELULAR: Se determinaron los volúmenes y concentraciones del fluorocromo (DAPI) y de un colorante contraste (Eosina Y); este último debido a que no contábamos con el dispositivo de contraste de fases en nuestro microscopio. Este colorante posee alta afinidad con proteínas comúnmente encontradas en el

citoplasma celular contrastando con el colorante fluorescente (DAPI) con afinidad por el nucleóide bacteriano. Los mejores resultados fueron obtenidos aplicando, después del paso de fijación, 10 μL de DAPI (0.125 mg/mL de solución salina) y posteriormente 8 μL de Eosina Y (0.7 mg/mL de agua destilada).

IV) DENSIDAD CELULAR: Estudiando diferentes diluciones del cultivo celular en fase exponencial ($\sim 2 \times 10^8$ células/mL), se determinó que una dilución al 25% ($\sim 5 \times 10^7$ células/mL) de este cultivo, resultó en una distribución de células más adecuada para las lecturas en el campo de visión.

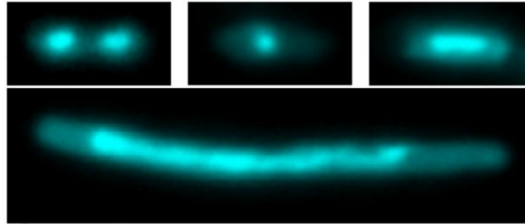
En la Figura 2, se presenta un esquema general de protocolo usado en la presente tesis.

Figura 2. Esquema general del protocolo de tinción fluorescente modificado.



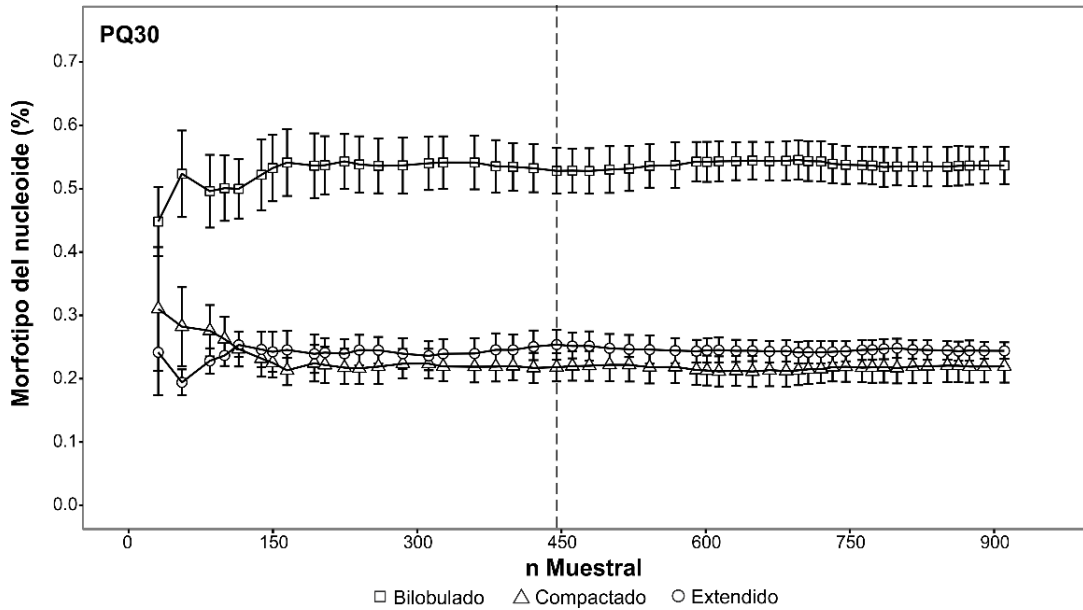
Una vez estandarizado el protocolo, se desarrolló un análisis de los morfotipos existentes para el nucleóide de *E. coli*; identificando aquellos descritos previamente por Odsbu & Skarstad (2014) (Figura 3).

Figura 3. Arriba: Morfotipos del nucleoide de *E. coli*. Se presentan de izquierda a derecha los morfotipos bilobulado, compactado y extendido. Abajo: Célula filamentososa de longitud $\geq 4.4 \mu\text{m}$ según lo indicado por Volkmer & Heinemann (2011).



Con el fin de conocer el número mínimo de células que se deben usar para calcular las frecuencias de morfotipos del nucleoide, estos morfotipos se contaron en 50 campos ópticos diferentes en tres experimentos independientes y replicados. Se consideró como adecuado, aquel número de células a partir del cual los valores de error estándar de las medias de cada morfotipo se mantienen constantes. Como se indica en la Figura 3, los errores estándar para estos morfotipos son mayores cuando el número de campos leídos son bajos; pero a medida que se incrementa el número de campos leídos, disminuye el error estándar estimado para cada morfotipo hasta un valor donde se estabiliza. Aquí se seleccionó para las lecturas un valor de 21 campos ópticos que como promedio equivale a 445 ± 41 células leídas (Figura 4).

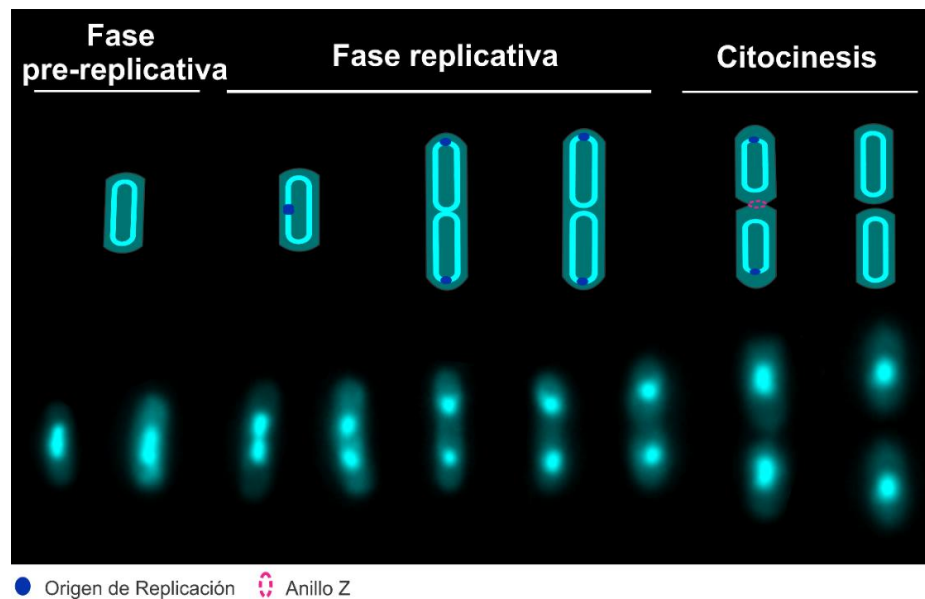
Figura 4. Comportamiento del error estándar de los valores medios de frecuencias de morfotipos del nucleoide en la cepa *E. coli* PQ30. Cada punto representado por morfotipo, corresponde al número de campos ópticos leídos; por tanto, los valores medios de frecuencias presentados fueron calculados con base al número de células presentes por campos ópticos. La línea punteada representa el campo óptico 21.



3.2. MORFOTIPOS DEL NUCLEOIDE EN ESTIRPES CELULARES DE *E. COLI* EN FASE EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO

El nucleoide de *E. coli*, dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentre, puede presentar tres morfotipos diferentes. Estos son: i) extendido, cuando la célula se encuentra en fase pre-replicativa; ii) bilobulado, cuando la célula está realizando de manera simultánea la replicación de su genoma y la segregación del mismo a sus cromosomas hijos; y iii) compactado, inmediatamente después de la citocinesis, puesto que la división celular ha terminado y la célula madre bilobulada ha dado origen a dos células hijas con el nucleoide ubicado en su parte media (Fisher et al. 2013; Kleckner et al. 2014).

Figura 5. Ciclo celular de *E. coli* bajo condiciones de crecimiento exponencial. Arriba, esquema construido según lo indicado por Fisher et al. (2013) y por Kleckner et al. (2014). Abajo, montaje fotográfico del ciclo de división celular usando el protocolo de tinción fluorescente descrito en la Figura 2.



Bajo condiciones de crecimiento exponencial la estirpe *E. coli* PQ30 con genotipo salvaje mostró mayor porcentaje (51%) del morfotipo de nucleoide bilobulado; mientras que los morfotipos compactado (23%) y extendido (26%), estuvieron en menor proporción (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias de las diferentes morfotipos de nucleoide para las estirpes PQ30 (silvestre), PQ37 (*uvrA*), IN400 (*recJ*) e IN250 (*recN*), cultivadas bajo condiciones de crecimiento exponencial. Se presentan, los valores medios y sus correspondientes errores estándar calculados de cuatro (4) experimentos independientes.

Estirpes bacterianos	Morfotipos del nucleoide (%)		
	Bilobulado	Compactado	Extendido
PQ30 (silvestre)	51 ± 3	23 ± 1	26 ± 4
PQ37(<i>uvrA</i>)	51 ± 1 n.s.	14 ± 1 *	35 ± 1 *
IN400 (<i>recJ</i>)	34 ± 1 *	15 ± 2 n.s.	51 ± 2 *
IN250 (<i>recN</i>)	43 ± 2 n.s.	18 ± 1 n.s.	39 ± 1 *

*, Diferencias significativas ($p \leq 0.05$ en la prueba de Tukey) respecto a la cepa salvaje. n.s., No existen diferencias significativas.

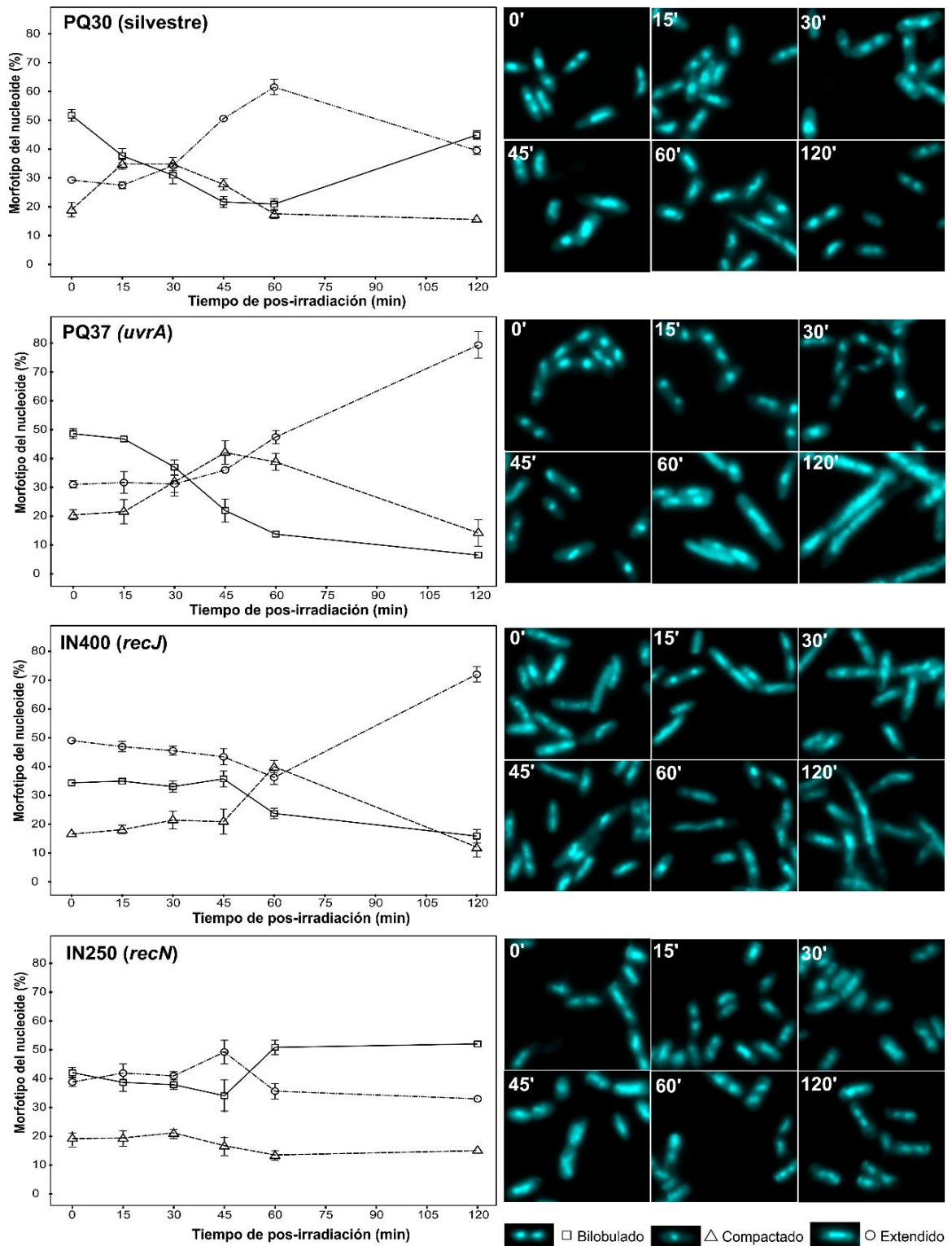
Considerando que el morfotipo de nucleoide bilobulado es indicativo de células en división, resulta interesante que sólo el 51% de las células de la población celular se encuentran en división aún bajo condiciones óptimas de crecimiento (fase exponencial). Esto indica, que bajo tales condiciones el 26% de las células del cultivo requiere algún tipo de procesamiento de su genoma antes que la célula se divida. El morfotipo de nucleoide bilobulado mostró una significativa reducción en la estirpe celular IN400. Se conoce que la exonucleasa RecJ forma parte del complejo enzimático involucrado en el re-ensamblaje de la horquilla de replicación detenida por lesiones en el ADN (Courcelle et al. 1999; Courcelle & Hanawalt 1999; 2001; Courcelle et al. 2003; Chow & Courcelle 2004; Courcelle et al. 2006); lo cual explica los resultados con la estirpe IN400. Por su parte, el morfotipo de nucleoide compactado mostró una leve pero significativa reducción en la estirpe celular PQ37; sugiriendo que la proteína UvrA puede ser importante en el proceso de compactación del nucleoide bacteriano. Se conoce que la proteína UvrA, la cual forma parte de la Escinucleasa UvrABC, participa en el reconocimiento de fotoproductos en el genoma (Kisker et al. 2013); pero no en los procesos de compactación del nucleoide bacteriano. Este último proceso, ha sido asociado con proteínas de la familia SMC (mantenimiento estructural de los cromosomas, de sus siglas en inglés), como son la Cohesina, Condensina, SbcCD (Rad50) y RecN (Pellegrino et al. 2012). Resulta interesante, que la proteína RecN además participa en el reconocimiento de roturas de doble cadena de ADN producidas por radiación gamma aglutinando la maquinaria enzimática que repara este tipo de lesión (Meddows et al. 2005). Queda por demostrar, si proteínas que reconocen fotoproductos en el genoma como UvrA, son también importantes para la compactación del cromosoma bacteriano. Por último, todas las estirpes mutantes (PQ37, IN400 e IN250) mostraron un significativo incremento en la frecuencia del morfotipo de nucleoide extendido, respecto a la cepa salvaje. Este morfotipo extendido, se asocia con un activo metabolismo del genoma; en especial, con actividad de reparación de daños en el ADN (Odsbu & Skarstad 2014). Por tanto, es de esperar que estirpes celulares con deficiencias en mecanismos de reparación

de ADN muestren tales resultados. Estas estirpes requieren de otros mecanismos que suplan su deficiencia para reparar daños genéticos y; por ende, mayor tiempo para alistar la célula para la división celular. Esto es particularmente cierto, en el caso de la estirpe IN400; cuya deficiencia genética (*recJ*) le impide restaurar la horquilla de replicación detenida en las regiones dañadas del ADN.

3.3. DINÁMICA POST-IRRADIACIÓN DEL NUCLEOIDE DE *E. COLI*

Cuando la célula de *E. coli* es expuesta a la radiación ultravioleta (UV), se detiene la replicación de su ADN y su división celular. Recientemente se demostró, que la restauración de la división celular post-irradiación inicia con eventos de compactación del nucleoide en los que participan proteínas de rutas celulares de reparación por recombinación del daño genético como son: RecA, RecO, RecR y RecN (Odsbu & Skarstad 2014). En esta tesis, se evaluó la importancia de las proteínas UvrA, RecJ y RecN sobre los eventos post-irradiación de compactación y des-compactación del nucleoide en *E. coli*. Usando el genotipo silvestre *E. coli* PQ30 se pudo evidenciar, que durante los primeros 30 min pos-irradiación se incrementó la forma compactada del nucleoide y se redujo la forma bilobulada (células en división); mientras que, la forma relajada se mantuvo básicamente constante. Entre los 30 y 60 min, se evidenció un significativo incremento de la forma relajada con una simultánea reducción de las formas compactadas y bilobuladas. A partir de los 60 min, se evidencia un incremento de la forma bilobulada con una simultánea reducción de la forma relajada; mientras que la compactada permanece constante (Figura 6).

Figura 6. Dinámica post-irradiación del nucleóide bacteriano en las estirpes celulares de *E. coli* PQ30 (silvestre), PQ37 (*uvrA*), IN400 (*recJ*) e IN250 (*recN*). Se presentan, los valores medios de frecuencias de morfotipos de nucleóide y sus correspondientes errores estándar (n = 4).



Estos resultados muestran, que existe una dinámica re-organizativa del nucleoide bacteriano post-irradiación, que tiende a restaurar las proporciones de morfotipos de nucleoide existente en la célula antes de la irradiación. Primero, se compacta el nucleoide en la zona central de la célula irradiada. Segundo, se extiende el nucleoide a lo largo de la célula para que este pueda ser reparado, expresado, etc. Tercero, la célula entra en la fase replicativa de su genoma; la cual se evidencia mediante un morfotipo bilobulado del nucleoide que termina en citocinesis o división celular. Esta dinámica de compactación y des-compactación también ha sido evidenciada en células de *Bacillus subtilis* (Smith et al. 2002) y de la arquea *Haloferax volcanii* (Delmas et al. 2013). Estos hallazgos sugieren que la dinámica de compactación y des-compactación del nucleoide bacteriano post-irradiación, está genéticamente conservada en el mundo microbiano.

La dinámica post-irradiación del nucleoide bacteriano se vio afectada en las estirpes celulares PQ37 (*uvrA*) e IN400 (*recJ*); las cuales mostraron un retardo de la fase de compactación a los 45 y 60 min, respectivamente; como se ha mostrado previamente en estirpes celulares con mutación en el gen *recF* (Odsbu & Skarstad 2014). Ambas estirpes celulares mostraron un abrupto incremento de la forma relajada después de la fase de compactación. Adicionalmente, se evidenció para estas cepas una reducción de la forma bilobulada a partir de los 15 y 45 min, respectivamente; indicando que la pérdida de función de la proteína UvrA resultó más drástica para la restauración de la división celular que la pérdida de función en RecJ. Como indicamos anteriormente, la proteína UvrA forma parte de la Escinucleasa UvrABC, reconociendo los fotoproductos en el genoma dañado (Kisker et al. 2013). Por su parte, la Exonucleasa RecJ forma parte del complejo enzimático RecQ/RecJ involucrado en el re-ensamblaje de la horquilla de replicación detenida en la lesión del ADN (Courcelle et al. 1999; Courcelle & Hanawalt 1999; 2001; Courcelle et al. 2003; Chow & Courcelle 2004; Courcelle et al. 2006). Esto explica las diferencias en la dinámica post-irradiación de nucleoide bacteriano, encontradas en estas cepas respecto a la cepa silvestre. Por último, la estirpe IN250 (*recM*) no mostró incrementos de la forma compactada a lo largo de

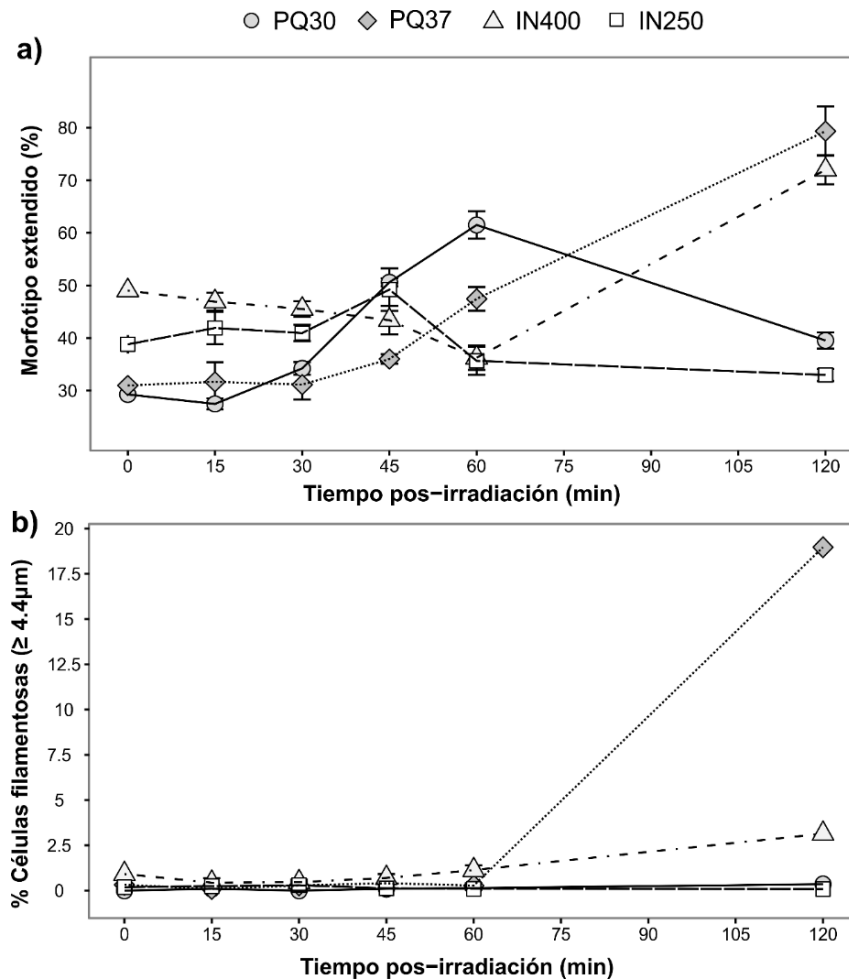
su cinética pos-irradiación en correspondencia con un estudio previo (Odsbu & Skarstad 2014), confirmando su participación en el proceso de compactación del nucleóide bacteriano. Sin embargo, dicha cepa mostró a los 45 min post-irradiación, un ligero, pero significativo incremento del morfotipo relajado del nucleóide; el cual estuvo acompañado de una pequeña reducción del morfotipo bilobulado. Luego, y hasta los 60 min post-irradiación, se incrementó el morfotipo bilobulado y se redujo el relajado. Ambos morfotipos, entonces mostraron valores de frecuencias constantes hasta los 120 min. Esto indica que la proteína RecN no es importante para la restauración de la división celular post-irradiación.

En resumen, el trabajo confirma el papel central de la proteína RecN en el proceso de compactación del nucleóide bacteriano post-irradiación. Aquí se demostró que la dinámica de compactación y des-compactación del nucleóide bacteriano puede ser alterada en el tiempo por deficiencias genéticas para proteínas esenciales como UvrA y RecJ que participan en procesos celulares de reparación del daño genético y restauración de la replicación del genoma, respectivamente. Que las estirpes celulares PQ37 (*uvrA*) e IN400 (*recJ*) no pueden incrementar la frecuencia del morfotipo bilobulado del nucleóide. Esto indica, que tanto los eventos de reparación de fotoproductos por la Escinucleasa UvrABC como el re-ensamblaje de la horquilla de replicación por el complejo RecQ/RecJ, son determinantes para que la célula bacteriana restaure su división celular.

3.4 RELACIÓN ENTRE LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS FILAMENTOSAS POST-IRRADIACIÓN Y EL MORFOTIPO EXTENDIDO DEL NUCLEÓIDE.

En la Figura 7a, se resumen los resultados obtenidos sobre la dinámica post-irradiación del morfotipo extendido en las cuatro estirpes celulares estudiadas; presentadas en el acápite anterior.

Figura 7. Dinámica pos-irradiación para el morfotipo extendido del nucleoide (a) y la filamentación celular (b), en las estirpes celulares de *E. coli* PQ30 (silvestre), PQ37 (*uvrA*), IN400 (*recJ*) y IN250 (*recM*). Se presentan, valores medios y sus correspondientes errores estándar, calculados a partir de cuatro (4) experimentos independientes.



Como ya indicamos, dicha dinámica mostró que el morfotipo extendido incrementó significativamente en las estirpes PQ37 (*uvrA*) y IN400 (*recJ*) a los 120 min pos-irradiación; mientras que las estirpes PQ30 (silvestre) y IN250 (*recM*) mostraron disminución en el morfotipo extendido para este tiempo de recuperación post-irradiación. En concordancia con la dinámica de la Figura 6a, el porcentaje de células filamentosas (Figura 7b) incrementó significativamente en las estirpes PQ37 (*uvrA*) e IN400 (*recJ*) a los 120 min pos-irradiación; mientras que, las estirpes PQ30

(silvestre) y IN250 (*recM*) no mostraron filamentación celular. Estos hallazgos sugieren que el evento de filamentación celular en *E. coli* está estrechamente relacionada con un morfotipo extendido del nucleoide donde existe un activo metabolismo del ADN, en especial, enfocado en la reparación de daños genéticos que bloquean la replicación del genoma.

Evelyn Witkin, en su trabajo pionero sobre la respuesta SOS en bacterias (Witkin 1976), fue la primera en observar que después de un tratamiento con luz UV las células de *E. coli* no formaban el septo característico de la división celular; sino que continuaban creciendo formando un largo filamento. Hoy conocemos que dos proteínas están directamente implicadas en la inhibición del proceso de formación del septo de la pared celular, los productos de los genes *sulA* y *sulB* (George et al. 1975; Gottesman et al. 1981); ambos bajo la regulación de circuito RecA/LexA (Little & Mount 1982). El gen *sulA* (*sfiA*) codifica para una proteína de 18 KDa (Schoemaker et al. 1984), a la cual se le atribuye la función de inhibidor de la síntesis del septo de la pared celular (Huisman & D'Ari, 1981). El producto del gen *sulB* (*sfiB*, *ftsZ*); por el contrario, es una GTPasa que tiene un papel central en la fase inicial de la síntesis del septo de la pared celular durante la división celular (Begg et al. 1995). Esta proteína, forma un anillo en el sitio de división, previo a la ocurrencia de la invaginación de la pared celular (Bi & Lutkenhaus, 1991). Las evidencias experimentales muestran que el blanco molecular de la proteína SulA, es la mencionada GTPasa. La proteína SulA bloquea la formación de la estructura anular en la GTPasa o SulB (Bi & Lutkenhaus 1993; Higashitani et al. 1995); con la participación de su región N-terminal (residuos 3-27) y de los últimos 21 aminoácidos de la región C-terminal (Higashitani et al. 1997). Estos autores, además mostraron que la región central de la proteína SulA (residuos Arg62, Leu67, Trp77 y Lys87), es esencial para su actividad inhibitoria durante la síntesis del septo de la pared celular.

Lewis et al. (1994), para determinar el grado de divergencia entre cualesquiera secuencia de 20 nucleótidos y la “caja SOS”, definieron el índice de heterología como: $HI = \sum \ln[(n_{(consensos)} + 0.5/n_{(actual)} + 0.5)]$; donde $n_{(consensos)}$ es la frecuencia de

ocurrencia del par de bases más común (consenso) en una posición particular de los sitios de reconocimiento del represor (operadores), $n_{(\text{actual})}$ es el número de veces que sitios conocidos de la secuencia tienen la base que está siendo analizada. El valor de 0.5 es una aproximación usada para corregir el uso de muestra de pequeño tamaño. Valores bajos de HI indican un mejor ajuste a la secuencia consenso y sugieren una fuerte interacción represor-operador. Estos autores han indicado, que las “cajas SOS (5'-TACTG(TA)₅CAGTA-3')” con valores de HI < 15 generalmente se unen bien al represor LexA. Adicionalmente, estudios *in vitro* evidenciaron que a mayor grado de similitud de las cajas SOS con la secuencia consenso, mayor es la fortaleza de la represión de la proteína LexA (Berg 1988; Schnarr et al. 1991). Se ha indicado que el valor de HI para el gen *sulA* está entre 4.65 - 5.39 (Lewis et al. 1994; Courcelle et al. 2001; Fernández De Henestrosa et al. 2000).

Usando la técnica de micro arreglos de ADN en *E. coli*, se observaron altos niveles de inducción del gen *sulA* durante los primeros 5 min post-irradiación con una dosis de 40 J/m² de UVC; inducción que fue sostenida hasta los 60 min post-irradiación (Courcelle et al. 2001). Por su parte, Kuzminov (1999) indica que el gen *sulA*, junto a los genes SOS *umuC* y *umuD*, son inducidos tardíamente durante la respuesta SOS; en especial, cuando el nivel de daño genético es muy alto y estos daños no pueden ser reparados por mecanismos de reparación libre de error imposibilitando así restaurar la replicación del ADN. Prada Medina et al. (2016), usando estirpes celulares con la fusión de transcripción *sulA::LacZ* (Casadaban & Cohen, 1979), mostraron que la expresión del gen *sulA* en las estirpes PQ37 (*uvrA*) y IN400 (*recJ*) irradiadas con 10 J/m² de UVB fue significativa a partir de los 30 y 120 min post-irradiación; contrastando con los resultados observados en el fenotipo silvestre (PQ30) quien no induce la respuesta SOS a esta dosis de radiación. Cuando esta última estirpe fue irradiada con una dosis de 120 J/m² de UVB, mostró inducción del gen *sulA* a partir de los 60 min post-irradiación; la cual se redujo significativamente a partir de los 120 min post-irradiación.

En conjunto, todos estos trabajos previos indican que la inducción del gen *sulA* post-irradiación puede variar en el tiempo dependiendo del fenotipo de la estirpe celular

usada. Aquí, el evento de filamentación celular (fenotipo) se observó solo a 120 min post-irradiación; lo cual está en concordancia con la hipótesis que sostiene que *sulA* se induce bajo condiciones tardías de inducción de la respuesta SOS (Kuzminov 1999). Contrastando con los resultados previos en nuestro laboratorio (Prada Medina et al. 2016), donde se mostró que el inhibidor del septo celular en la estirpe PQ37 (*uvrA*) es inducido significativamente a partir de los 30 min post-irradiación, en la presente tesis no se observa el fenotipo de filamentación celular hasta los 120 min post-irradiación. Interesantemente, esto no fue así en el caso de la estirpe celular IN400 (*recJ*); donde tanto la inducción del gen *sulA* como la aparición del fenotipo filamentación celular, son significativos a partir de los 120 min post-irradiación. Esto sugiere, que en las células de *E. coli* la proteína *SulA* podría inducirse tempranamente, pero el desarrollo del filamento celular podría estar influenciado por otros factores desarrollándose más tardíamente. Esta hipótesis supone que los eventos de reparación de fotoproductos pueden ocurrir vía recombinación homóloga como previamente se ha mostrado (Prada Medina et al. 2016), y que la reparación del daño, la restauración de la horquilla de replicación y división celular son eventos que ocurren simultáneamente durante la respuesta SOS según lo sugerido por Rudolph et al. (2007).

Usando la técnica de RT-PCR cuantitativa, nuestro equipo de trabajo ha observado que, bajo la condición de irradiación aquí usada, son significativamente expresados diferentes genes SOS (Anexo A, Fuentes J. L. comunicación personal). Entre los genes que muestran mayores niveles de expresión, se encuentran los genes *recA* y *recN*; ambos involucrados en los mecanismos de reparación por recombinación. Adicionalmente, son inducidos los genes *dinD* y *yebG* que se conocen son inducibles durante la respuesta SOS (Quillardet et al. 2003); pero aún se mantienen de función desconocida. Aunque además fueron inducidos en menor medida otros genes de ADN polimerasas (*polB* y *umuC*), los resultados claramente sugieren que la recombinación homóloga es esencial para la reparación del daño producido por UV. Esto estudios soportan nuestra hipótesis que sostiene que las células de *E. coli*

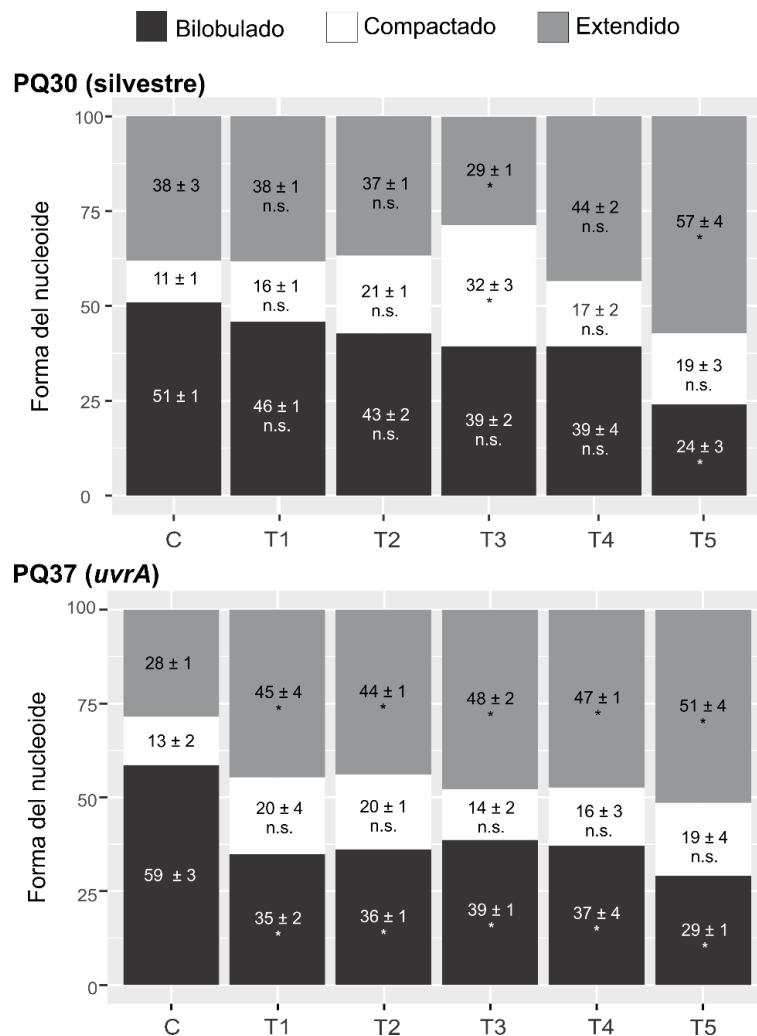
con el morfotipo extendido de nucleoide, se encuentran reparando el daño genético producido por la UV.

3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO MODULADOR DEL MORFOTIPO DEL NUCLEOIDE BACTERIANO POR COMPUESTOS NATURALES QUE INHIBEN LA RESPUESTA SOS

La presente tesis además evaluó el potencial efecto modulador de compuestos terpenos (Carvacrol y *p*-Cimeno) y flavonoides (Pinocembrina, Apigenina y Resveratrol) que inhiben la respuesta SOS (Fuentes et al, en preparación); sobre los morfotipos del nucleoide bacteriano en *E. coli*. Para ello, se escogieron dos cepas, PQ30 (silvestre) y PQ37 (*uvrA*); las cuales mostraron resultados contrastantes en los ensayos previos y, probablemente, serán más informativas. Basado en similares criterios, se consideró el tiempo de incubación de 120 min post-irradiación como el más informativo. En la Figura 8, se presentan las proporciones de morfotipos del nucleoide bacteriano para ambas cepas, al ser expuestas a tratamientos con los diferentes compuestos. En la cepa PQ30, el control de no tratamiento (agua destilada) mostró los siguientes porcentajes de morfotipos del nucleoide: bilobulado (51%), compactado (11%) y extendido (38%). En dicha cepa, todos los compuestos mostraron una relativa disminución del morfotipo bilobulado del nucleoide respecto al control; pero solo resultó con una reducción significativa, el tratamiento con Resveratrol (51 versus 24%). Por su parte, el morfotipo compactado mostró un significativo incremento (11 versus 32%) respecto al control cuando las células son tratadas con Pinocembrina. Por último, el morfotipo extendido mostró un significativo incremento con el tratamiento con Resveratrol (38 versus 57%) y una significativa reducción en el tratamiento con Pinocembrina (38 versus 29%). Por su parte, la cepa PQ37 mostró los siguientes porcentajes de morfotipos del nucleoide en el control no tratado: bilobulado (59%), compactado (13%) y extendido (28%). En dicha cepa, todos los tratamientos con compuestos mostraron significativas reducciones del morfotipo bilobulado y significativos

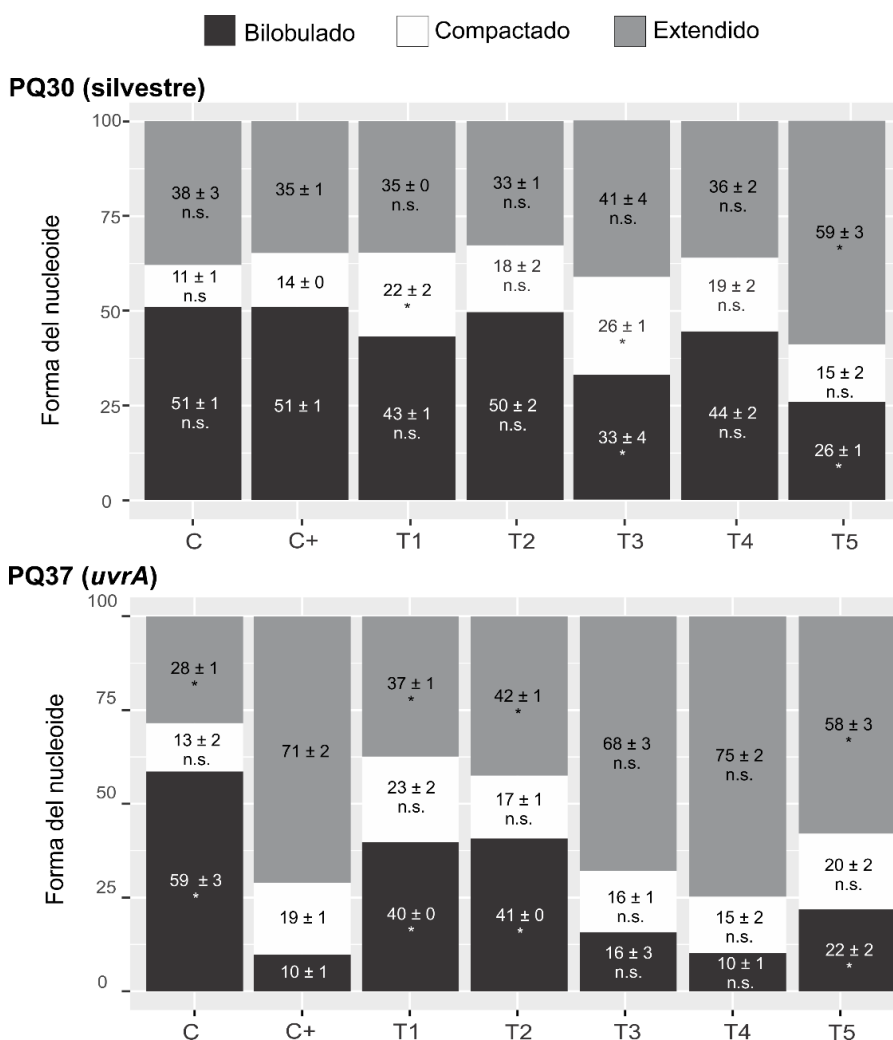
incrementos de la forma extendida del nucleoide respecto al control. Por su parte, el morfotipo compactado no mostró significativas diferencias respecto al control en ninguno de los tratamientos. Estos resultados muestran claramente que los compuestos terpenos y flavonoides estudiados modulan los procesos de compactación y des-compactación del nucleoide bacteriano.

Figura 8. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleoide bacteriano en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (*uvrA*) a los 120 min de incubación. El número de células contadas por tratamiento fue ≥ 500 células. Se presentan los valores medios y sus correspondientes errores estándar calculados de cuatro (4) experimentos independientes. C: agua destilada, T1: Carvacrol (140.1 $\mu\text{g/mL}$), T2: *p*-Cimeno (89 $\mu\text{g/mL}$), T3: Pinocembrina (15.4 $\mu\text{g/mL}$), T4: Apigenina (1.95 $\mu\text{g/mL}$) y T5: Resveratrol (146.5 $\mu\text{g/mL}$). *, diferencias significativas ($p \leq 0.05$ en un test de Tukey) respecto al control no tratado. n.s., no significativo.



En la Figura 9, se presentan las proporciones de morfotipos del nucleóide bacteriano para ambas cepas, al ser expuestas a los diferentes co-tratamientos de compuestos y UVB.

Figura 9. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleóide bacteriano post-irradiación en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (*uvrA*) a los 120 min de incubación. El número de células contadas por tratamiento fue ≥ 500 células. Se presentan los valores medios y sus correspondientes errores estándar calculados de cuatro (4) experimentos independientes. C: agua destilada, C+: 10 J/m² de UVB, T1: Carvacrol (140.1 μ g/mL) + UVB, T2: *p*-Cimeno (89 μ g/mL) + UVB, T3: Pinocembrina (15.4 μ g/mL) + UVB, T4: Apigenina (1.95 μ g/mL) + UVB y, T5: Resveratrol (146.5 μ g/mL) + UVB. *, Diferencias significativas ($p \leq 0.05$ en un test de Tukey) respecto al control irradiado. n.s., no significativo.



En la cepa PQ30, el control de no tratamiento (agua destilada) mostró los siguientes porcentajes de morfotipos del nucleoide: bilobulado (51%), compactado (11%) y extendido (38%). Similar proporción en los morfotipos del nucleoide (bilobulado \approx 51%, compactado \approx 14% y extendido \approx 35%) se encontró en el control irradiado con 10 J/m² de UVB (C+), indicando que a 120 min post-irradiación todo el daño producido por este tratamiento fue reparado y la división celular restablecida como se indicó en el acápite 3.3. En dicha cepa, los co-tratamientos con los compuestos Pinocembrina y Resveratrol mostraron una significativa disminución del morfotipo bilobulado del nucleoide respecto al control irradiado. Por su parte, el morfotipo compactado mostró un significativo incremento respecto al control irradiado cuando las células son co-tratadas con Carvacrol y Pinocembrina. Por último, el morfotipo extendido mostró un significativo incremento respecto al control irradiado en el co-tratamiento con Resveratrol (35 versus 59%).

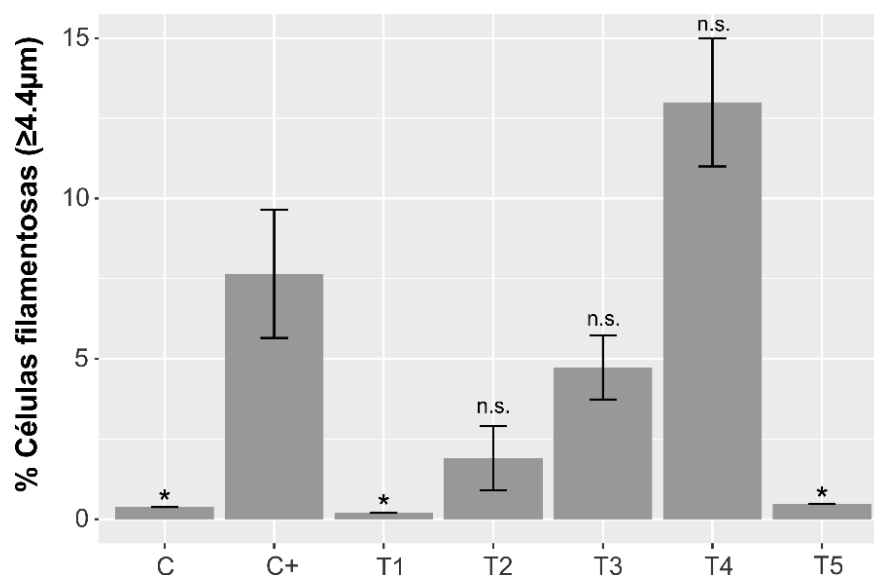
Por su parte, la cepa PQ37 mostró los siguientes porcentajes de morfotipos del nucleoide en el control no tratado: bilobulado (59%), compactado (13%) y extendido (28%). Por el contrario, el control irradiado mostró significativos cambios en las proporciones de los morfotipos respecto al control no irradiado como sigue: bilobulado (10%), compactado (19%) y extendido (71%). Esto mostró la alta sensibilidad de la cepa PQ37 a la UVB; la cual produce un drástico bloqueo de la división celular. En dicha cepa, los co-tratamientos con los compuestos Carvacrol, *p*-Cimeno y Resveratrol, mostraron significativos incrementos del morfotipo bilobulado y significativas reducciones de la forma extendidas del nucleoide respecto al control. Por su parte, el morfotipo compactado no mostró significativas diferencias respecto al control en ninguno de los co-tratamientos. Estos resultados muestran claramente que los compuestos aquí mencionados modulan los procesos de reparación del daño y división del nucleoide bacteriano.

En resumen, los resultados muestran notoriamente que los compuestos terpenos y flavonoides estudiados modulan los procesos de compactación y des-compactación del nucleoide bacteriano; especialmente, aquellos procesos de reparación del daño genético que ocurren durante la fase extendida del nucleoide y los procesos de

división del nucleóide bacteriano; tanto en tratamientos simples como en co-tratamientos con UVB.

En la Figura 10, se presentan los porcentajes de células filamentosas ($\geq 4.4 \mu\text{m}$) para la cepa PQ37, tras la exposición a los diferentes co-tratamientos de compuestos y UVB.

Figura 10. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la filamentación de la estirpe celular PQ37 (*uvrA*) a los 120 min de incubación post-irradiación. El número de células contadas por tratamiento fue ≥ 500 células. Se presentan los valores medios y sus correspondientes errores estándar calculados de cuatro (4) experimentos independientes. C: agua destilada, C+: 10 J/m^2 de UVB, T1: Carvacrol (140.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + UVB, T2: *p*-Cimeno (89 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + UVB, T3: Pinocembrina (15.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + UVB, T4: Apigenina (1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + UVB y, T5: Resveratrol (146.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + UVB. *, diferencias significativas ($p \leq 0.05$ en un test de Tukey) respecto al control irradiado. n.s., no significativo.



Los co-tratamientos con los compuestos Carvacrol, *p*-Cimeno, Pinocembrina y Resveratrol mostraron una reducción del % de células con filamentación respecto al control irradiado; mientras que el co-tratamiento con Apigenina generó un incremento en la filamentación celular. Un estudio previo (Bandyopadhyay et al.

2013) propuso que la supresión de la reparación SOS en bacterias por vegetales, puede ser un mecanismo de antimutagénesis y protección. Como demostramos en el presente trabajo, los eventos de filamentación celular están estrechamente relacionados con la fase extendida del nucleoide bacteriano. Adicionalmente se mostró, que compuestos como el Carvacrol, *p*-Cimeno, Pinocebrina y Resveratrol, reducen la filamentación y muestra signos de restauración de la división celular por incremento del morfotipo bilobulado del nucleoide respecto al control irradiado. Por el contrario, la Apigenina produce niveles importantes de filamentación celular y mostró frecuencias del morfotipo bilobulado del nucleoide similares al control irradiado. En resumen, todos estos datos sugieren que tales compuestos podrían resultar promisorios como bio-antimutágenos que modulan los procesos de división celular; en algunos casos favoreciendo los procesos de reparación del daño genético producidos por la UVB.

4. CONCLUSIONES

La restauración de la división celular pos-irradiación en *E. coli* se caracteriza por una dinámica re-organizativa del nucleoide con tres pasos secuenciales principales: compactación, des-compactación y segregación cromosómica acoplada con citocinesis; que tiende a restaurar las proporciones de morfotipos de nucleoide existentes en la célula antes de la irradiación

Dicha dinámica se ve modificada en ausencia de las funciones *uvrA* y *recJ*; evidenciándose la importancia de los eventos de reparación de los fotoproductos por la Exonucleasa UvrABC y del re-ensamblaje de la horquilla de replicación por el complejo RecQ/RecJ, respectivamente; para la restauración de la división celular post-irradiación en *E. coli*. Además, se confirma el papel central de la proteína RecN en el proceso de compactación del nucleoide de *E. coli* post-irradiación.

Nuestros hallazgos sugieren que el evento de filamentación celular en *E. coli* está estrechamente relacionado con el morfotipo extendido del nucleoide; donde existe un activo metabolismo del ADN, en especial, enfocado en la reparación de los daños genéticos que bloquean la replicación del genoma.

Compuestos naturales que inhiben la respuesta SOS como son: Apigenina, Carvacrol, *p*-Cimeno, Pinocembrina y Resveratrol, modulan los procesos de compactación y des-compactación del nucleoide bacteriano; especialmente, aquellos procesos de reparación del daño genético que ocurren durante la fase extendida del nucleoide y los procesos de división del nucleoide bacteriano; tanto en tratamientos simples como en co-tratamientos con UVB.

5. RECOMENDACIONES

Realizar la dinámica de post-irradiación del nucleoide de *E. coli* en las mismas condiciones evaluadas para cepas deficientes para otros genes involucrados en la reparación por recombinación homóloga y en la reparación vía síntesis translesión.

Complementar las dinámicas de post-irradiación del nucleoide de *E. coli* con otras metodologías (RT-PCR, cuantificación de dímeros de pirimidina, entre otros), que permitan generar información valiosa a la hora de hacer asociaciones entre diferentes eventos celulares.

Realizar las dinámicas de post-irradiación del nucleoide de diferentes especies bacterianas, con el fin de evaluar la posible conservación de dicha dinámica de compactación y des-compactación del nucleoide en el mundo microbiano.

BIBLIOGRAFÍA

- Aravind L, Walker DR, Koonin E V. 1999. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.* 27:1223–1242.
- Bagg A, Kenyon CJ, Walker GC. 1981. Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:5749–5753.
- Bandyopadhyay N, Gautam S, Sharma A. 2013. Suppression of SOS repair in *E. coli*: possible mechanism of antimutagenicity and protective effects of common vegetables. *Int J Food Sci Nutr.* 7486:1–8.
- Beehler BC, Przybyszewski J, Box HB, Kulesz-Martin MF. 1992. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis.* 13:2003–2007.
- Begg KJ, Dewar SJ, Donachie WD. 1995. A new *E. coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol.* 177:6211–6222.
- Berg OG. 1988. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins: the LexA protein and the arginine repressor use different strategies for functional specificity. *Nucleic Acids Res.* 16:5089–5105.
- Bi E, Lutkenhaus J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature.* 354:161–164.
- Bi E, Lutkenhaus J. 1993. Cell Division Inhibitors SulA and MinCD Prevent Formation of the FtsZ Ring. *J. Bacteriol.* 175:1118–1125.
- Breña-Valle M, Serment-Guerrero J. 1998. SOS induction by gamma-radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis.* 13:637–641.
- Britt AB. 1999. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci.* 4:20–25.

- Casadaban MJ, Cohen SN. 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4530–4533.
- Chow KH, Courcelle J. 2004. RecO Acts with RecF and RecR to Protect and Maintain Replication Forks Blocked by UV-induced DNA Damage in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 279:3492–3496.
- Courcelle CT, Chow K-H, Casey A, Courcelle J. 2006. Nascent DNA processing by RecJ favors lesion repair over translesion synthesis at arrested replication forks in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:9154–9159.
- Courcelle J, Crowley DJ, Hanawalt PC. 1999. Recovery of DNA Replication in UV-Irradiated *Escherichia coli* Requires both Excision Repair and RecF Protein Function. *J Bacteriol*. 181:916–922.
- Courcelle J, Donaldson JR, Chow K-H, Courcelle CT. 2003. DNA damage-induced replication fork regression and processing in *Escherichia coli*. *Science*. 299:1064–1067.
- Courcelle J, Hanawalt PC. 1999. RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 262:543–551.
- Courcelle J, Hanawalt PC. 2001. Participation of recombination proteins in rescue of arrested replication forks in UV-irradiated *Escherichia coli* need not involve recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8196–8202.
- Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*. 158:41–64.
- Delmas S, Duggin IG, Allers T. 2013. DNA damage induces nucleoid compaction via the Mre11-Rad50 complex in the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol*. 87:168–179.
- Eisen JA, Hanawalt PC. 1999. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res*. 435:171-213.

- Fernández De Henestrosa a R, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H, Woodgate R. 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 35:1560–1572.
- Fisher JK, Bourniquel A, Witz G, Weiner B, Prentiss M, Kleckner N. 2013. Four-dimensional imaging of *E. coli* nucleoid organization and dynamics in living cells. *Cell*. 153:882–895.
- Fogliano M, Schendel P. 1981. Evidence for the inducibility of the *uvrB* operon. *Nature*. 289:196–198.
- George J, Castellazzi M, Buttin G. 1975. Prophage induction and cell division in *E. coli*. III. Mutations *sfiA* and *sfiB* restore division in *tif* and *lon* strains and permit the expression of mutator properties of *tif*. *Mol Gen Genet*. 140:309–332.
- Gottesman S, Halpern E, Trisler P. 1981. Role of *sulA* and *sulB* in Filamentation by *Lon* Mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol*. 148:265–273.
- Higashitani A, Higashitani N, Horiuchi K. 1995. A Cell Division Inhibitor of *Escherichia coli* Directly Interacts with *FtsZ* Through GTP Hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 209:198–204.
- Higashitani A, Ishii Y, Kato Y, Horiuchi K. 1997. Functional dissection of a cell-division inhibitor, *SulA*, of *Escherichia coli* and its negative regulation by *Lon*. *Mol Gen Genet*. 254:351–357.
- Hiraga S, Niki H, Ogura T, Ichinose C, Mori H, Ezaki B. 1989. Chromosome Partitioning in *Escherichia coli*: Novel Mutants Producing Anucleate Cells. *J Bacteriol*. 171:1496–1505.
- Huisman O, D’Ari R. 1981. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature*. 290:797–799.
- Kenyon CJ, Walker GC. 1981. Expression of the *E. coli uvrA* gene is inducible. *Nature*. 289:808–810.
- Khanin R, Vinciotti V, Wit E. 2006. Reconstructing repressor protein levels from expression of gene targets in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:18592–18596.

- Kisker C, Kuper J, Van Houten B. 2013. Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a012591.
- Kleckner N, Fisher JK, Stouf M, White M a, Bates D, Witz G. 2014. The bacterial nucleoid: nature, dynamics and sister segregation. *Curr Opin Microbiol.* 22:127–137.
- Kuzminov A. 1995. Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 16:373–384.
- Kuzminov a. 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:751–813.
- Lewis LK, Harlow GR, Gregg-Jolly LA, Mount DW. 1994. Identification of High Affinity Binding LexA which Define New DNA Damage-inducible Genes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 241:507–523.
- Little JW, Mount DW. 1982. The SOS Regulatory System of *Escherichia coli*. *Cell.* 29:11–22.
- Meddows TR, Savory AP, Grove JI, Moore T, Lloyd RG. 2005. RecN protein and transcription factor DksA combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Mol Microbiol.* 57:97–110.
- Mitchell DL, Byrom M, Chiarello S, Lowery MG. 2001. Effects of chronic exposure to ultraviolet B radiation on DNA repair in the dermis and epidermis of the hairless mouse. *J Invest Dermatol.* 116:209–215.
- Odsbu I, Skarstad K. 2014. DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on RecN and RecA. *Microbiology.* 160:872–882.
- Pellegrino S, Radzimanowski J, De Sanctis D, Erba EB, McSweeney S, Timmins J. 2012. Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: New insights into double-strand break repair. *Structure.* 20:2076–2086.
- Prada Medina CA, Aristizabal Tessmer ET, Quintero Ruiz N, Serment-Guerrero J, Fuentes JL. 2016. Survival and SOS response induction in ultraviolet B irradiated *Escherichia coli* cells with defective repair mechanisms. *Int J Radiat Biol.* 3002:1–8.

- Quillardet P, Hofnung M. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat Res.* 147:65–78.
- Quillardet P, Rouffaud M-A, Bouige P. 2003. DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 154:559–72.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org>.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. 2009. Base excision repair: The long and short of it. *Cell Mol Life Sci.* 66:981–993.
- Rudolph CJ, Upton AL, Lloyd RG. 2007. Replication fork stalling and cell cycle arrest in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Genes & Development.* 21:668–681.
- Rudolph CJ, Upton AL, Lloyd RG. 2008. Maintaining replication fork integrity in UV-irradiated *Escherichia coli* cells. *DNA Repair.* 7:1589–1602.
- Sancar A, Rupp WD. 1983. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell.* 33:249–260.
- Schnarr M, Oertel-Buchheit P, Kazmaier M, Granger-Schnarr M. 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie.* 73:423–431.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9:671–675.
- Schoemaker JM, Gayda RC, Markovitz A. 1984. Regulation of Cell Division in *Escherichia coli* : SOS Induction and Cellular Location of the Sula Protein , a Key to Ion-Associated Filamentation and Death. *J Bacteriol.* 158:551–561.
- Smith BT, Grossman AD, Walker GC. 2002. Localization of UvrA and Effect of DNA Damage on the Chromosome of *Bacillus subtilis* Localization of UvrA and Effect of DNA Damage on the Chromosome of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 184:488–493.
- Van Laethem A, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P. 2005. The sunburn cell:

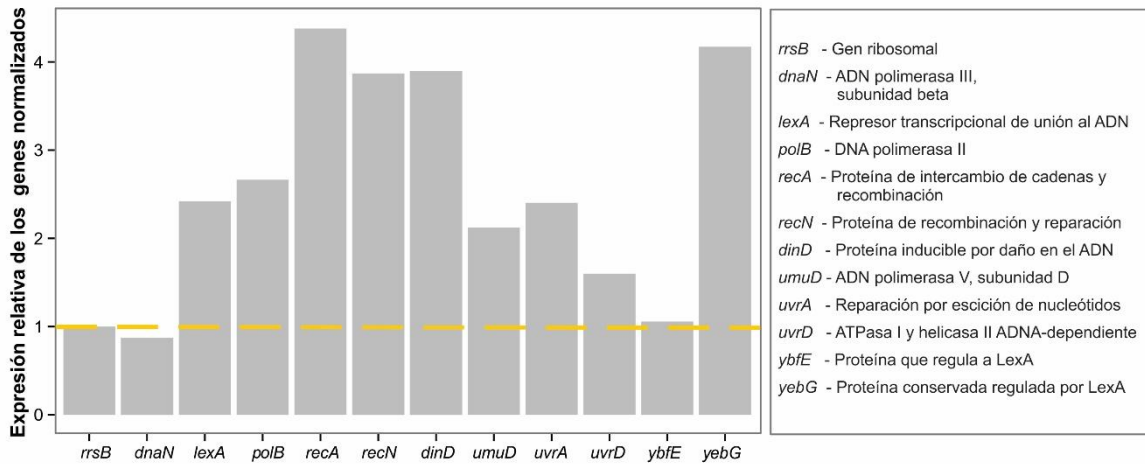
Regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:1547–1553.

Volkmer B, Heinemann M. 2011. Condition-Dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. *PLoS One.* 6:1–6.

Witkin EM. 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 40:869–907.

ANEXOS

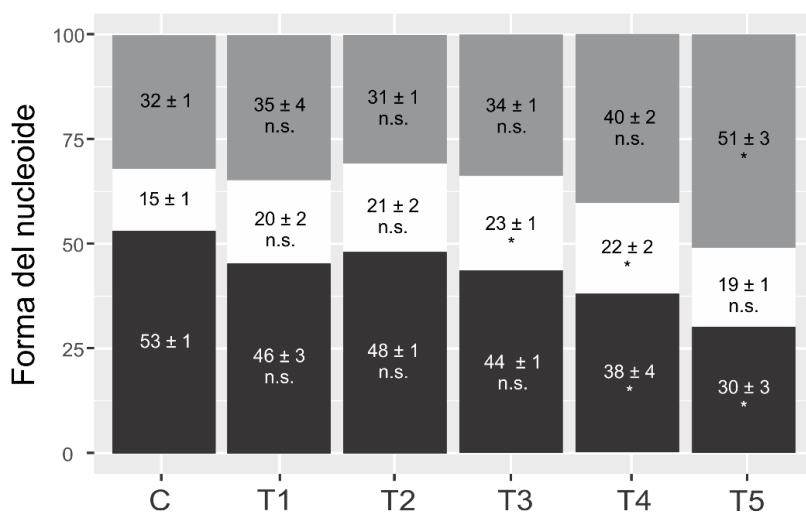
Anexo A. Análisis de la expresión de genes inducidos por la RUV en *Escherichia coli* mediante la técnica qRT-PCR. Datos generados en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la UIS publicados en esta tesis con autorización del director del laboratorio y tutor de esta tesis Jorge Luis Fuentes Lorenzo.



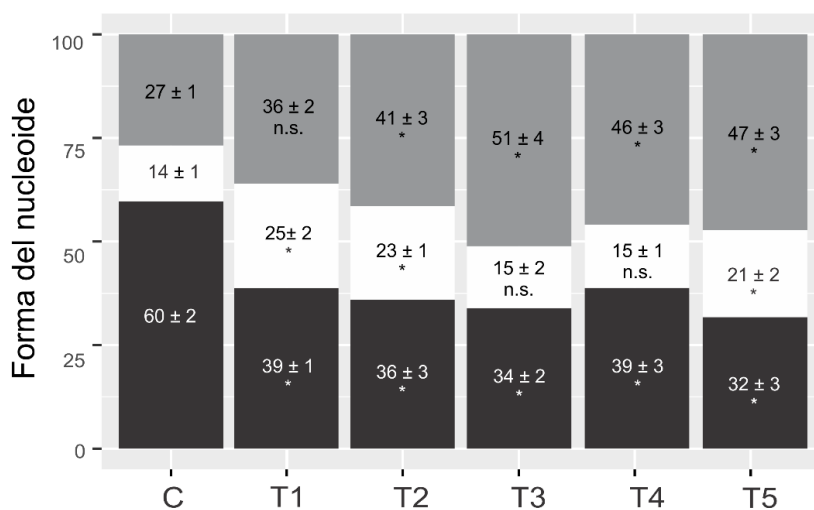
Anexo B. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleóide bacteriano en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (*uvrA*) a los 60 min de incubación. El número de células contadas por tratamiento fue ≥ 500 células. Se presentan los valores medios y sus correspondientes errores estándar calculados de cuatro (4) experimentos independientes. C: agua destilada, T1: Carvacrol (140.1 $\mu\text{g/mL}$), T2: *p*-Cimeno (89 $\mu\text{g/mL}$), T3: Pinocebrina (15.4 $\mu\text{g/mL}$), T4: Apigenina (1.95 $\mu\text{g/mL}$) y T5: Resveratrol (146.5 $\mu\text{g/mL}$). *, diferencias significativas ($p \leq 0.05$ en un test de Tukey) respecto al control no tratado. n.s., no significativo.

■ Bilobulado □ Compactado ■ Extendido

PQ30 (silvestre)



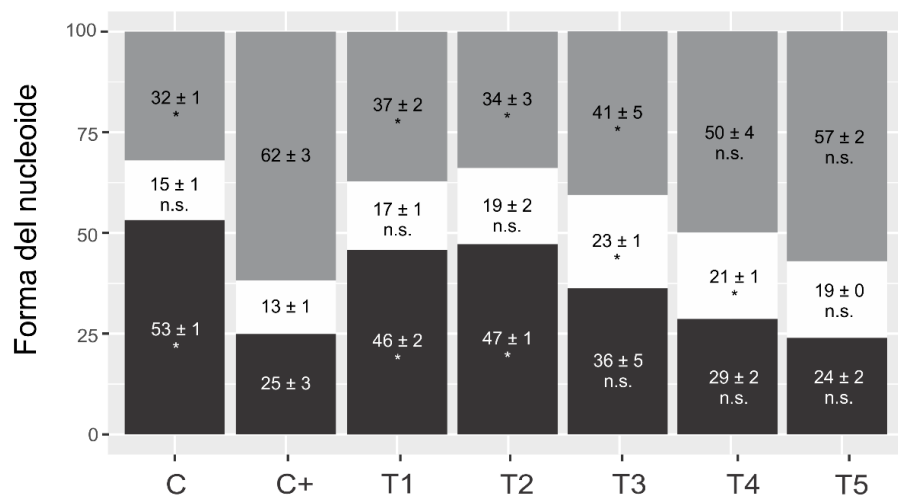
PQ37 (*uvrA*)



Anexo C. Efectos de diferentes compuestos terpenos y flavonoides sobre la dinámica de morfotipos del nucleóide bacteriano post-irradiación en las estirpes celulares PQ30 (silvestre) y PQ37 (*uvrA*) a los 60 min de incubación. El número de células contadas por tratamiento fue ≥ 500 células. Se presentan los valores medios y sus correspondientes errores estándar calculados de cuatro (4) experimentos independientes. C: agua destilada, C+: 10 J/m² de UVB, T1: Carvacrol (140.1 μ g/mL) + UVB, T2: *p*-Cimeno (89 μ g/mL) + UVB, T3: Pinocebrina (15.4 μ g/mL) + UVB, T4: Apigenina (1.95 μ g/mL) + UVB y, T5: Resveratrol (146.5 μ g/mL) + UVB. *, diferencias significativas ($p \leq 0.05$ en un test de Tukey) respecto al control irradiado. n.s., no significativo.

■ Bilobulado □ Compactado ■ Extendido

PQ30 (silvestre)



PQ37 (*uvrA*)

