

0036)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

5

**EFFECTO DE LOS NITRATOS DE PLOMO
Y DE CALCIO SOBRE LA ACCIÓN
MUTAGÉNICA Y RECOMBINOGÉNICA
DEL METILMETANOSULFONATO EN**

Drosophila melanogaster

291460

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

MA. EUGENIA I. HERES Y PULIDO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ULRICH GRAF

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Héctor mi esposo, compañero y amigo solidario, porque juntos hemos recorrido exitosamente este accidentado camino.

A nuestros hijos, Paloma, Héctor y Luis Felipe, con el convencimiento de que el ejemplo educa.

A mis padres, maestros por vocación que impulsaron en mí, múltiples aprendizajes

A mis hermanas, profesionistas las tres y mujeres del siglo 21

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ulrich Graf por su invaluable amistad, valiosa enseñanza, confianza y apoyo para realizar esta tesis.

Al Dr. Hansjörg Frei por su también invaluable amistad, paciente enseñanza, empeño, guía y tremendo conocimiento de la estadística indispensable para la consecución de esta tesis.

Al Dr. F.E. Würigler por el apoyo otorgado para la realización de los experimentos de esta tesis en el Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) en Schwerzenbach, Suiza.

A la valiosa colaboración de Julika Bussmann, Margrit Cavegn y Verena Lippuner quienes con su eficiencia conservan las líneas de *Drosophila melanogaster* y facilitaron la realización de los experimentos.

A los jurados de esta tesis quienes ejercen su compromiso con la enseñanza a través de sus revisiones, a pesar de sus otras obligaciones.

A los inventores del correo electrónico ¡gracias!

RESUMEN

El Pb pertenece al grupo de metales pesados que por su toxicidad se han relacionado con problemas de salud y de contaminación ambiental. Los mecanismos de carcinogénesis de los metales pesados son entendidos pobremente, pero se propone que pueden afectar a las células a través de dos mecanismos: daño oxidante e inhibición de la reparación del ADN. Algunos de estos cationes interfieren además en funciones básicas como la replicación y la transcripción del ADN. Por lo anterior se investigó sobre los conocimientos actuales de los genes de *Drosophila* que están involucrados en los diversos mecanismos reparación y otras funciones celulares relacionadas con estos eventos. La prueba en las alas SMART es una prueba *in vivo* que se realiza con la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* y detecta mutación y recombinación somáticas. Ésta es un sistema sensible que identifica agentes genotóxicos y cuantifica el daño inducido. Se basa en la pérdida de la heterocigosidad en células imágales que formarán el ala en el estado adulto, la cual es provocada por varios eventos mutagénicos y por recombinación de los genes marcadores recesivos *múltiple wing hair* (*mwh*) y *flare* (*flr*). Los cationes divalentes que han mostrado ser positivos en esta prueba son Cr^{6+} , Mo^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Los negativos son Cr^{3+} , Mo^{6+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} . Debido a que el plomo interacciona con el calcio, se consideró importante evaluar el efecto genotóxico de los nitratos de ambos metales en esta prueba. Se alimentaron larvas de la craza estándar con soluciones 0.1, 0.5 y 1 mM en protocolos de pretratamiento y post-tratamiento con o sin metilmetanosulfonato (MMS, 12 mM). El MMS se dio en un tratamiento agudo por 2 h (72-74 h de edad larvaria), sumergiéndolas en una solución del mutágeno mezclada con celulosa en polvo. Las alas de las moscas transheterocigóticas para los marcadores, se montaron y revisaron para determinar la frecuencia y la talla de manchas simples, gemelas y totales. Se estudió la relación entre la inducción de clones mutantes y el efecto genotóxico o modulador del plomo y del calcio. Los análisis involucraron análisis estadístico con pruebas paramétricas y no paramétricas. Los resultados muestran que con los protocolos utilizados no hay efecto genotóxico o modulador del plomo y del calcio *in vivo*. Sin embargo se detectó una cantidad mayor de manchas totales en las moscas de los pretratamientos, alimentadas o no con MMS. Lo anterior demuestra que en la prueba del ala es importante considerar cómo son manipuladas las larvas. También se observó que las hembras tienen más manchas que los machos, sobre todo con MMS. Lo anterior puede ser explicado de diversas maneras, pero la diferencia en la respuesta de los dos sexos con este ensayo no se había considerado teóricamente. La ausencia de efectos genotóxicos o moduladores por el plomo y el calcio en este ensayo *in vivo*, permite concluir que la homeostasis en *Drosophila*, como en otros organismos, puede ser eficiente para defenderse de los efectos de tóxicos de estos metales.

RESUMEN

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Efectos genotóxicos de agentes alquilantes 1

1.1.1. Genes sensibles a mutágenos 2

1.2. Efectos del plomo 2

1.2.1. Efectos genotóxicos del plomo 2

1.2.2. Exposición y toxicidad del plomo 4

1.2.3. Efectos bioquímicos 5

1.2.4. Carcinogénesis por plomo 5

1.3. Efectos genotóxicos del estrés oxidante 6

1.4. Reparación del daño en el ADN 7

1.4.1. Tipos de daños en el ADN 7

1.4.2. Mecanismos de reparación del ADN 11

1.4.2.1. Reparación pre-replicadora 12

a. Reparación directa 12

b. BER: reparación por escisión de bases 15

c. NER: reparación por escisión de nucleótidos 20

1.4.2.2. Fidelidad de la síntesis del ADN (reparación durante la replicación) 25

a. Prevención de errores 25

1.4.2.3. Reparación post-replicadora 26

a. Tolerancia a los defectos durante la síntesis o translesión 26

b. Unión de SSBs y dobles DSBs 26

c. Recombinación defectuosa; reparación post-replicadora recombinogénica de rompimientos en ambas hebras (DSB) 26

d. Reparación de desemparejamientos o corrección de errores (MMR: mismatch repair) 27

e. Reparación meiótica 29

f. Genes sensibles a mutágenos, sin clasificar 29

g. Otras proteínas y genes de *Drosophila* involucrados en la reparación del ADN 29

h. Reguladores del ciclo celular o puntos de verificación 30

1.5. Efectos de los metales sobre la reparación del ADN 30

1.5.1. Participación de los cationes metálicos divalentes en la reparación del ADN 31

1.5.2. Mecanismos de reparación que son influidos por los cationes metálicos divalentes 32

1.5.3. Efecto del plomo en la reparación del ADN 34

1.5.4. Interacciones entre el calcio y el plomo 36

1.5.5. El Ca^{2+} como señal de transducción o segundo mensajero 36

1.5.4. Niveles intracelulares del Ca^{2+} y la reparación del daño en el ADN 37

1.6. *Drosophila melanogaster* 38

1.6.1. La prueba en las alas (SMART) 38

1.6.2. Cruzas estándar 40

1.6.3. Distribución de la frecuencia de manchas 40

1.6.4. Pruebas de Ji cuadrada y de U en SMART 41

1.7. Objetivos 43

2. MATERIALES Y MÉTODOS 43

- 2.1. Agentes químicos 43
- 2.2. Líneas de *Drosophila melanogaster*: *mwh* y *flr³/TM3, Bd^S* 43
- 2.3. Diseño experimental 43
- 2.4. Tratamientos 46
- 2.5. Revisión de manchas por individuo 47
- 2.6. Análisis estadístico 48
- 2.7. Consulta en FlyBase-Listings 2001 50

3. RESULTADOS 51

- 3.1. Análisis estadístico con SMART (Prueba de U, Wilcoxon-Mann-Whitney) 51
- 3.2. Ji cuadrada y sobredispersión de las manchas totales 62
- 3.3. Anova factorial, Bonferroni/Dunn, Prueba de H, Prueba de U 62
 - 3.3.1. Nitrato de calcio 63
 - 3.3.2. Análisis estadístico de cada uno de los tratamientos con nitrato de calcio 66
 - 3.3.3. Nitrato de plomo 76
 - 3.3.4. Análisis estadístico individual de los tratamientos con nitrato de Pb 79
 - 3.3.5. Testigos positivos MMS y uretano 89
- 3.4. Diferencias en la frecuencia de manchas totales en machos y en hembras 94
- 3.5. Frecuencia, tamaño y distribución de los clones *mwh* 94
- 3.6. Frecuencia de las manchas gemelas / individuo 100
- 3.7. Interpretación de los resultados de ANOVA factorial 105
 - 3.7.1. ANOVA de manchas totales/individuo en los tratamientos B1, B2, B3 y B4
 - 3.7.2. Interpretación de ANOVA factorial de manchas totales/individuo obtenidas entre los testigos de manipulación mínima (B0) y los testigos paralelos (B1)...118

4. DISCUSIÓN 121

- 4.1. Efectos del MMS 121
- 4.2. Efectos del sexo 121
- 4.3. Efectos de los tratamientos 122
- 4.4. Efectos del Cu^{2+} y del Pb^{2+} 123
- 4.5. Interacciones de segundo orden 125

5. CONCLUSIONES 126

6. REFERENCIAS 127

7. APÉNDICE 138

Tablas de la Introducción 138

Tablas de Resultados 157

ABREVIATURAS

- AA** Agentes alquilantes
ALAD Deshidratasa del ácido amino levulínico
ALAS Sintetasa del ácido aminolevulínico
AMPc Monofosfato de adenin cíclico
ANOVA Análisis de varianza
AP Sitios apurínicos/apirimídicos
BER Reparación por escisión de bases
CyP450 Familia del citocromo P450
DDT Dicloro-difenil-tricloroetano
Zn finger Región o dominio de la proteína en donde se insertan varios átomos de Zn.
DSBs Rompimientos dobles del ADN
DUTPasa Deoxyuridina trifosfato nucleotidohidrolasa
Endonucleasas AP Enzimas que cortan el enlace fosfodiéster de la cadena de ADN en el sitio 5' AP
ENU Etil nitrosourea
EPA Agencia de Protección Ambiental de los EUA
ERCC *Excision repair cross complementing*
ESSR Sitios sensibles a la UV endonucleasa
FAD Flavin adenín dinucleótido
FaPy Lesiones formamidopirimidinas en el ADN
GSH Glutación: tripéptido γ -glutamilcisteinilglicina
H₂O₂ Peróxido de hidrógeno.
IARC Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IRBP/Kup70 *Inverted repeat binding protein* y proteína Ku 70, componentes de la *DNA-activated protein kinase (DNA-PK)* dependiente de serina/treonina.
Liasas AP Enzimas con actividad glucosilasa y endonucleasa
Mismatches. Desemparejamientos en los pares de bases A=T ó G=C del ADN
MMR Corrección de errores.
MMS Metil metanosulfonato
MNNG Metil nitrosoguanidina
MNU Metil nitrosourea
N3-MeA N3-Metiladenina
N7-MeG N7-Metilguanina
NER Reparación por escisión de nucleótidos
O⁶-MGT O⁶-Metiltransferasas
O⁶-AGT O⁶-Alquilguanina-ADN-alquiltransferasa
O⁶-MeG O⁶-Metilguanina
OMS Organización Mundial de la Salud.
OPS Organización Panamericana de la Salud.
⁸-oxoG ⁸-oxoguanina.
PCNA Antígeno de proliferación celular
PKC Cinasa C
ROS Especies reactivas de oxígeno.

-SH Grupos tiol

SMART Prueba de mutación y recombinación somáticas.

SOS Mecanismo de tolerancia al daño en el ADN

SSBs Rompimientos sencillos en el ADN

TFIIH Factor b de transcripción de la ARN polimerasa II

UDS Síntesis de ADN no programada.

UvrABC Genes *uvr* de la reparación por escisión de nucleótidos en procariontes (*NER*)

XP Genes de *Xeroderma pigmentosum*

1. INTRODUCCIÓN

El estudio del daño en el ADN provocado por agentes químicos, sus efectos y su reparación es el objetivo de la Genética Toxicológica, área de la investigación en la que se incluye el presente trabajo. Los compuestos genotóxicos pueden clasificarse de acuerdo con su metabolismo, el tipo de uniones que forman y los efectos biológicos debidos a la interacción con el ADN. Una vez formados los enlaces o dañado este ácido nucleico, esto puede ser reparado por sistemas enzimáticos.

Considerando su metabolismo, los agentes genotóxicos pueden ser directos cuando no requieren activación enzimática porque reaccionan directamente con el ADN o con las proteínas. Indirectos o promutágenos los necesitan activación metabólica para producir daño en la doble cadena. No es fácil clasificar a los genotóxicos de acuerdo con el tipo de enlaces o las adiciones a este ácido nucleico, porque los metabolitos de los promutágenos pueden ser varios. Entre los genotóxicos directos están los alquilantes, como el metil metanosulfonato (MMS).

El papel genotóxico de los metales y la modulación que ejercen sobre el daño provocado por agentes físicos o químicos, es un campo de investigación que requiere profundizarse. Hay una controversia que surge de investigaciones que demuestran o desechan su influencia sobre la reparación del daño. En este trabajo se utilizó la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como modelo para demostrar el efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción genotóxica del metilmetano sulfonato, a través de la prueba de mutación y recombinación somáticas en las alas (SMART) diseñada por Graf *et al.* (1984).

1.1. Efectos genotóxicos de agentes alquilantes (AA)

La mayoría de los mutágenos reactivos son electrofílicos. Los agentes alquilantes (AA) son compuestos electrofílicos con afinidad a los centros nucleofílicos de las macromoléculas orgánicas como el ADN. Los AA transfieren grupos alquilo al ADN, al ARN y a las proteínas. Los reactivos finales del metil metanosulfonato (MMS) y del dietil metanosulfonato (DMS) son los iones metilo $[\text{CH}_3]^+$. Para la metil nitrosourea (MNU) y el pro-mutágeno dimetil-nitrosamina (DMN) son los iones $[\text{CH}_3\text{-N}_2]^+$. En todos ellos la carga positiva los hace electrofílicos.

Los AA monofuncionales, como la metil nitrosourea (MNU) y la etil nitrosourea (ENU), tienen un grupo reactivo que interacciona covalentemente con algún centro nucleofílico del ADN. Los agentes bifuncionales como la mostaza nitrogenada, tienen dos grupos reactivos que pueden reaccionar con dos sitios del ADN. El metil metanosulfonato (MMS) es un AA con dos grupos metilo, que es monofuncional porque sólo un metilo es donado a cualquier oxígeno o nitrógeno de las bases, excepto el N1 de las pirimidinas y el N9 de las purinas que se unen a la d-ribosa. Produce en una mayoría N7-metilguanina (N7-MeG) y N3-metiladenina (N3-MeA) (Vogel, 1986) y poca O⁶-metilguanina (O⁶-MeG) (Glaab *et al.*, 1999). La alquilación del oxígeno en los enlaces fosfodiéster produce fosfotriésteres en muy baja proporción (1%) (Friedberg *et al.*, 1995).

La alquilación de las bases, en particular los N-alquilo son reparados eficientemente por excisión de bases (BER) y de nucleótidos (NER), por recombinación post-replicadora de homólogos (de Buendía, 1998) y en parte por reparación de desemparejamientos (MismatchRepair, MMR) (Glaab *et al.*, 1999). La alquilación debilita el enlace N-glucosídico de la base con el C1 del azúcar y facilita la formación del sitioapurínico/apirimídico (AP). Los sitios AP pueden romperse espontáneamente si no son

reparados a tiempo. Por lo tanto, indirectamente, la N-alquilación de las bases produce rompimientos en el esqueleto azúcar-fosfato de la cadena de ADN.

1.1.1. Genes sensibles a mutágenos

En *Drosophila* se conocen cerca de 35 genes sensibles a mutágenos, de los cuales 28 lo son al MMS (APÉNDICE, Tablas 1.1 y 1.2). Sólo se han localizado genes sensibles a los mutágenos en los cromosomas 1, 2 y 3, pero no en el 4. Muchos genes sensibles a mutágenos están involucrados en la reparación del ADN. Sus nombres se abrevian como *mus.* (*standing for mutagen sensitive*); los genes *mus1.* están ubicados en el cromosoma X, *mus2.* y *mus3.* se localizan en los autosomas 2 y 3, respectivamente. Los genes sensibles a mutágenos más estudiados por sus efectos en la deficiencia de la reparación de los procesos de la mutagénesis son *mus101*, *mus201* y *mus302*.

La búsqueda de genes meióticos ha mostrado numerosos genes que en su mayoría afectan diferentes pasos de la meiosis en las hembras. Otros inciden además o solamente en los machos. Sus símbolos son *mei.*

Se ha encontrado que algunos de estos genes son también sensibles a los mutágenos. Estos genes en su condición silvestre participan además en la reparación del ADN. Los mutantes meióticos más estudiados por sus efectos sobre la reparación deficiente del ADN son *mei-9* y *mei-41* que están localizados en el cromosoma X.

La mayoría de los genes relacionados con la reparación del ADN, su fenotipo y similitudes con otros organismos se muestran en el APÉNDICE, Tabla 1.1 (Dusenbery y Smith, 1996; de Buendía, 1998; Internet FlyBase-Listings 2001: ff., <http://flybase.bio.indiana.edu:82/>; Med-Line 1990-2000).

1.2. Efectos del Plomo

El plomo y sus sales metálicas han sido muy estudiados con el objeto de dilucidar su papel genotóxico y tóxico. Este metal está presente en el ambiente y en algunos seres vivos, en niveles arriba de los permitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1990). En el ser humano el límite máximo de plomo inorgánico es de 10 µg/100 ml de sangre. Por encima de estos valores hay un claro efecto tóxico sobre los sistemas hematopoyético y nervioso. La presencia constante de este elemento, en compuestos orgánicos e inorgánicos de uso frecuente en el área urbana y rural, imposibilita que en numerosas ocasiones dichos niveles se mantengan en los permitidos (Corey y Galvao, 1989; Johnson, 1998). Su presencia constante a niveles aún por debajo de los recomendados podría tener efectos genotóxicos o tóxicos (Ferrante, 1979; O.P.S., 1979; Pounds, 1984; Corey y Galvao, 1989; Goyer, 1990; Hernández-Ávila *et al.*, 1991; Bellinger *et al.*, 1991; Weisel *et al.*, 1991; Simons, 1993; Fuentes-Aguilar y Soto-Mora, 1993; Fullmer, 1997 y Johnson, 1998). Estos efectos incidirían en los seres vivos como una fuente constante de cambio, de daño o modulación de las funciones celulares.

1.2.1. Efectos genotóxicos del plomo

Existen datos controvertidos sobre la acción genotóxica del plomo. Se ha demostrado que es capaz de inducir transformación *in vitro*, que bajo ciertas circunstancias es mutagénico, que actúa como modulando el daño producido por otros agentes y se considera carcinógeno real en roedores y potencial para humanos (Zelikoff *et al.*, 1988; IARC, 1994; Hartwig, 1995; Johnson, 1998). Las diferencias específicas de las toxicidades de los iones, como el Pb^{2+} ,

han sido relacionadas por Stohs y Bagchi (1995) con la solubilidad de sus compuestos, su absorción, el transporte, la reactividad química y los complejos que forman *in vivo*. Se ha visto que este metal participa en la reacción de Fenton, lo cual produce estrés oxidante al incrementar los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2$ y el H_2O_2 que impactan directamente al ADN (Roy y Rossman, 1992).

Los investigadores con varios ensayos han obtenido resultados sobre efectos genotóxicos positivos. Por ejemplo, se ha comprobado que el PbCl_2 provoca *in vitro* la disminución de la fidelidad en la transcripción (Sirover y Loeb, 1976) y aún concentraciones menores de 10^{-5} M inhiben la polimerasa del ADN. Frenkel y Middleton (1987) demostraron en núcleos aislados de células *HeLa*, que el acetato de plomo inhibe la síntesis de nucleicos. En la cepa WP2s de *Escherichia coli* deficiente en la reparación por escisión, el nitrato de plomo 0.32 mM indujo al profago lambda (Rossman *et al.*, 1984). En hígado y en riñón de rata el Pb^{2+} provocó la transcripción del gen para la glutatión S transferasa P (GST-P) y aumento en su ARNm. Este gen se activa en los procesos de hepatocarcinogénesis de la rata, por lo que se ha relacionado con la capacidad comprobada que tiene el plomo de causar cáncer en ratas y ratones, aún cuando este metal no se considera un mutágeno directo (Johnson, 1998).

En el ratón se ha utilizado el nitrato de plomo como testigo positivo de intercambio de cromátidas hermanas (Dhir *et al.*, 1993) y en *Allium cepa* se ha encontrado una relación de dosis respuesta entre la concentración de plomo y la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Lerda, 1992). En *Drosophila melanogaster* el acetato de plomo aumentó significativamente la pérdida de los cromosomas 4 y X en la 1ª generación evidenciada por los descendientes excepcionales (De la Rosa, 1984).

En los individuos expuestos a varios metales incluyendo el Pb^{2+} , ha sido positiva la presencia de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, habiéndose propuesto un papel sinérgico del Pb^{2+} con otros metales (Ferm, 1969; Bauchinger *et al.*, 1976; Gerber *et al.*, 1980).

Se han descrito resultados negativos como los de Amacher y Paillet (1982) en la inducción de mutantes resistentes a trifluoro-timidina en células L5178/TK+ a dosis bajas de acetato de plomo. Tampoco en el sistema de *Salmonella*/microsomos de mamífero, ni en el del huésped intermedio en ratón, se ha comprobado la actividad mutagénica del plomo (Goyer, 1990). También en pruebas de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en ratones (Jacquet *et al.*, 1977) los resultados fueron negativos. En *Drosophila melanogaster*, Rasmuson (1985) utilizó nitrato de plomo y cloruro de plomo con y sin MMS y obtuvo resultados negativos en el ensayo de genotoxicidad para el ojo. Esta prueba se basa en genes inestables posiblemente relacionados con transposones, que "saltan" dentro y fuera de los cromosomas por mecanismos que aún no han sido aclarados (Frei, comunicación personal).

En 1984, Hansen y Stern revisaron los datos que a esa fecha existían sobre los ensayos genotóxicos a corto plazo y de 14 ensayos se obtuvieron 5 positivos, 4 negativos y 5 con resultados controvertidos. Algunos autores relacionan la concentración del plomo o el tipo de tratamiento, con la genotoxicidad. Por ejemplo, en el ensayo del locus de hipoxantina fosforribosiltransferasa con células de criceto chino V79, Zelikoff *et al.* (1988) encontraron que la administración de nitrato (5 días) y de sulfuro de plomo (24 h) a concentraciones cercanas a 500 mM aumentaron 5 veces la tasa espontánea de mutación. Estos autores no observaron rompimientos, enlaces, adiciones o intercambios de cromátidas hermanas. Sólo cuando el acetato y el nitrato de plomo se utilizaron a dosis tóxicas se reportaron rompimientos sencillos (Roy y Rossman, 1992). Los experimentos para demostrar genotoxicidad, que utilizan condiciones no fisiológicas pueden provocar artefactos y

resultados falsos positivos. Las alteraciones de la presión osmótica, la ausencia de balance iónico, la toxicidad y otros eventos se han relacionado con rompimientos cromosómicos (Frei, comunicación personal).

La determinación de aberraciones cromosómicas en sujetos con exposiciones derivadas de su labor (O'Riordan y Evans 1974, Bauchinger *et al.*, 1976) o del ambiente (Bauchinger *et al.*, 1977) al plomo han dado resultados negativos. En linfocitos humanos expuestos a este metal se obtuvieron resultados positivos sólo cuando los cultivos se hicieron por más de 3 días o a concentraciones muy altas (Johnson, 1998). Por otra parte su relación con los niveles de calcio fue estudiada por Deknudt y Deminatti (1978) quienes administraron plomo a primates en dietas con niveles normales o bajos de calcio y encontraron anomalías cromosómicas en los animales con dieta baja en calcio.

1.2.2. Exposición y toxicidad del plomo

La toxicidad del plomo fue documentada desde 1713 por Rammazzini (Johnson, 1998). A partir de 1920 los compuestos orgánicos de tetraetilo y tetrametilo de plomo se utilizaron masivamente como antidetonantes en la gasolina. Lo anterior provocó un incremento del metal en la atmósfera e incidió en el aumento de los niveles de plomo inorgánico en la sangre de humanos. Este hecho alertó a las instituciones mundiales de salud, quienes insistieron con mayor o menor éxito en que se abandonara el uso de los aditivos de plomo en dicho combustible. Para mantener la calidad del aire en 0.5 a 1.0 μg de $\text{Pb}^{2+}/\text{m}^3$ de aire (OMS, 1990), su uso se ha restringido en la mayoría de los países.

La Agencia de Protección Ambiental (*EPA*) de los EUA considera al plomo entre uno de los 10 contaminantes más importantes del mundo. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*IARC*, 1994) lo incluye dentro del grupo 2B o sustancias que pueden ser identificadas como carcinógenas en los humanos. La regulación de su uso en soldaduras de lata y en envases de bebidas embotelladas ha permitido disminuir su aporte en los alimentos. Sin embargo, se sigue utilizando en baterías para automóvil, en el vidriado de la cerámica artesanal, municiones, pinturas, tinturas, cosméticos, soldaduras, pipas de agua, pesticidas, reactivos químicos, cerillos, raticidas, vidrio transparente, entre otros bienes y servicios. La *EPA* ha enlistado al plomo, al arsenato de plomo, al cromato de plomo, al dióxido de plomo, al fluoborato de plomo, al sulfuro de plomo y al sulfato de plomo como agentes químicos tóxicos que deben ser controlados (Johnson, 1998).

El envenenamiento con plomo produce en el ser humano de manera característica: anemia, alteraciones en el metabolismo de las porfirinas, fatiga, dolor de cabeza, depresión, pérdida de peso, esterilidad en ambos sexos, miocarditis, hipertensión, enfermedades renales como la proteinuria, aminoaciduria e hiperuricemia, problemas de aprendizaje y de conducta, alteraciones neurológicas como neuropatía periférica (parálisis) y del encéfalo, entre otras manifestaciones. La ausencia de niveles normales de calcio, de hierro o de alimento aumentan la toxicidad de este metal. Los iones de plomo atraviesan la placenta provocando defectos congénitos menores o alteraciones conductuales en el producto, debido a que interfieren en la comunicación entre las células durante el desarrollo e inducen la acumulación de neurotoxinas (Johnson, 1998).

1.2.3. Efectos bioquímicos

La toxicidad del Pb^{2+} se ha relacionado con variables como el tipo de especie y tejido, el tiempo de exposición, el sexo, la edad (Sokol y Berman 1991), el tabaquismo y la ingestión de café y alcohol (Beck, 1992).

El plomo muestra gran afinidad por los fosfatos, por las cadenas laterales de cisteína e histidina de las proteínas, por las purinas, las pteridinas y las porfirinas. Se ha demostrado que el Pb^{2+} forma complejos de fosfatos con el Ca^{2+} , que surgen de invaginaciones de los núcleos de células de túbulo proximales de riñón (Vallee y Ulmer, 1972).

Las concentraciones de 10^{-3} y 10^{-4} M *in vitro* inhiben la actividad de proteínas con grupos sulfhidrilo (-SH), pero dichas concentraciones no se alcanzan fácilmente *in vivo*, porque primero se presenta toxicidad. A molaridades menores se inhiben algunas enzimas como la deshidratasa del ácido aminolevulínico (ALAD) y la sintetasa del ácido aminolevulínico (ALAS) provocando la acumulación del ácido aminolevulínico y de porfobilinógeno que actúan como neurotoxinas (Johnson, 1998). También inhibe algunas ATPasas y deshidrogenasas. Se une a los fosfatos de los nucleicos afectando su estructura y cataliza la hidrólisis no enzimática de nucleótidos como el ATP. En ciertos animales y vegetales se ha comprobado que desacopla la fosforilación oxidante y altera la estructura mitocondrial. También activa o inactiva enzimas al sustituir a los átomos de Zn^{2+} en los centros activos de las mismas (*Zn-finger*) o a átomos de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} y Mg^{2+} modificando la actividad y la especificidad de dichas proteínas. El Pb^{2+} al igual que los Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} y As^{2+} pueden tener efecto químico sobre los tioles no proteicos o reducirlos hasta 48%. Se ha observado que la sensibilidad para reparar el daño provocado por los rayos X en presencia de metales presenta relación con la disminución de los tioles no proteicos. La sensibilidad a los rayos X está mediada por los tioles y la interacción entre metales y tioles puede ser un factor importante en la modulación de la respuesta a la irradiación (Snyder y Lachmann, 1989).

1.2.4. Carcinogénesis por plomo

En animales

Se ha demostrado la capacidad de las sales de plomo para producir cáncer en animales. La administración de dosis altas por tiempos prolongados a ratas (79 ó 76 semanas), produjeron tumores renales en el 45% de los sobrevivientes si se administraban en la dieta (0.016 mM) y del 81% si se les daba en el agua (0.005 mM) (Kasprzak *et al.*, 1985; Koller *et al.*, 1986).

En el riñón de rata y de ratón y en el hígado de rata, una sola inyección de nitrato o acetato de plomo ha demostrado una potente actividad mitogénica, hiperplasia y proliferación celular sin necrosis celular (Calabrese y Baldwin, 1992; Coni *et al.*, 1993). La administración de nitrato por vía intravenosa en ratas indujo producción de la isoenzima GST7-7 asociada con la hepatocarcinogénesis (Dock, 1989) y en ratones, el plomo estimuló la actividad xenobiótica del glutatión hepático (Nakagawa, 1992). El Pb^{2+} suprime la síntesis del ARNm del citocromo Cyp4501a2 (Degawa *et al.*, 1993). Se ha observado que el óxido de plomo es cocarcinógeno al administrarse traquealmente con benzopireno a crickets sirios (Kobayashi y Okamoto, 1974).

En humanos

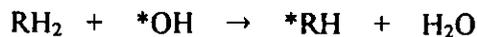
Con base en los resultados obtenidos en roedores se concluyó en el Séptimo Reporte Anual sobre Carcinógenos (IARC, 1994), que el acetato y el fosfato de plomo reunían requisitos para considerarlos de manera anticipada como carcinógenos humanos. Johnson (1998) reportó que los estudios epidemiológicos no han mostrado evidencias de que los compuestos

de plomo sean carcinogénicos para el hombre, aún en cantidades muy altas. Coni *et al.*, (1985) investigaron la mortalidad por cáncer en trabajadores de fundidoras y de baterías para automóvil, obteniendo un leve pero significativo aumento de la mortalidad por cáncer en los segundos, aunque no consideraron los efectos del tabaquismo.

1.3. Efectos genotóxicos del estrés oxidante

En células humanas y de criceto se ha visto que el MMS no induce ningún daño detectable de tipo oxidante al ADN, mientras que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sí lo hace por los radicales $*OH$ (Horváthová *et al.*, 1997).

Por otra parte el metabolismo celular, principalmente la reducción de oxígeno a agua durante la respiración mitocondrial produce de manera normal especies reactivas de oxígeno (ROS): un átomo de oxígeno $\frac{1}{2} O_2$, radicales peróxido $*O_2$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 y radicales $*OH$. Otras fuentes internas de ROS son la actividad en los peroxisomas, la síntesis enzimática del óxido nítrico y la fagocitosis de leucocitos. Fuentes externas son las radiaciones, el calentamiento, ciertas drogas y compuestos redox. Los radicales pueden tomar electrones de los residuos de macromoléculas orgánicas, de acuerdo con la siguiente reacción:



y continuar con una serie de reacciones en cadena que afectan a numerosas moléculas. Los radicales $*O_2$ y el H_2O_2 no interaccionan directamente con el ADN y el H_2O_2 tiene un rango de difusión significativo. Este compuesto por sí mismo no causa daño, pero puede formar radicales $*OH$ en un proceso en el que intervienen iones metálicos, típicamente el Fe^{2+} . La mayor fuente de daño es la formación de radicales $*OH$ que se forman por reacciones Fenton del H_2O_2 con un complejo ADN-Fe, de la siguiente manera:



A esta reacción se le llama reacción catalizada por metales de Haber-Weiss o reacción de Fenton. En esta reacción el ión metálico transfiere electrones desde el donador, hacia el peróxido de hidrógeno (Friedberg *et al.*, 1995). El daño oxidante que produce el plomo es a través de reacciones Fenton que forman ROS (Stoys y Bagchi, 1995).

Los radicales $*OH$ inciden en el azúcar del ADN produciendo fragmentación, pérdida de bases y rompimientos de la cadena con un extremo terminal de azúcar. Estos rompimientos son reparados por unión directa de los extremos. Los radicales $*OH$ también atacan al ADN produciendo lesiones *fal'y*, 8-hidroxyguanina y timina-glicol :

Estos daños son reparados en su mayoría por escisión de bases (BER) o por elementos que reconocen la distorsión de la molécula e inducen mecanismos de reparación del daño en el ADN.

*OH + adenina → Lesión *FaPy* (4,6-diamino-5-formamidopirimidina)

*OH + guanina → Lesión *FaPy* (2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina)
(efecto letal)

*OH + guanina → 8-hidroxiguanina
(produce desemparejamientos)

*OH + timina → timina glicol
(se bloquea la replicación)

1.4. Reparación del daño en el ADN

La tasa de error espontánea en la replicación del ADN es tan baja como 1/10 mil millones. La alta fidelidad de la replicación se logra por la cooperación de procesos enzimáticos, que hacen el sistema 100 millones de veces más exacto que en un sistema sin actividad catalítica. En la replicación las letras bioquímicas que codifican la información son cuatro nucleótidos y su orden es el que determina el significado del mensaje genético. En ocasiones los errores se presentan de manera espontánea, inducidos por agentes físicos o químicos externos o bien por compuestos intermedios presentes durante el metabolismo normal. Todo lo anterior induce una o más estrategias de reparación del ADN, para eliminar las lesiones potencialmente mutagénicas (Radman y Wagner, 1988).

1.4.1. Tipos de daños en el ADN

Las alteraciones en el ADN pueden provocar parejas de bases no complementarias o desemparejamientos. También se producen otros daños como sitios apurínicos o apirimídicos (AP), bases alteradas, rompimientos sencillos (*SSBs*), rompimientos dobles (*DSBs*), aductos y enlaces cruzados. Cuando cualesquiera de éstos no son reparados correctamente, se producen mutaciones, aberraciones cromosómicas, micronúcleos o aumento en el intercambio de cromátidas hermanas, entre otros efectos. La estructura de las proteínas, la abundancia y los distintos sistemas enzimáticos de reparación *in vivo*, son importantes para interpretar cómo los diversos tipos de daño son manejados de diferentes maneras en las células.

Desemparejamientos

Los desemparejamientos "*mismatches*" en el ADN consisten en la presencia de bases que no forman las parejas A=T o G=C en la doble cadena. En eucariotes se originan cuando no se incorporan las bases correctas al ADN replicador o por la formación de heterodúplex de ADN durante la recombinación meiótica. También se pueden dar por desaminación espontánea de las bases. Por ejemplo de la citosina (2-oxo-4-aminopirimidina) que forma uracilo (2,4-dioxopirimidina) el cual funciona como timina y la de adenina (6-aminopurina) que produce hipoxantina (6-oxopurina) la cual actúa como guanina.

Sitios sitios apurínicos/apirimídicos (AP)

Son sitios de la cadena del ADN que carecen de una base. Son resultado del corte del enlace glucosídico de la base nitrogenada (N1 de pirimidinas o N9 de purinas) con el C1 de la

desoxirribosa en el esqueleto de azúcar-fosfato del ADN. El corte puede ser espontáneo (frecuentemente por despurinación) o después de la alquilación de bases. Los sitios AP se forman también cuando una glucosilasa elimina una base dañada o extraña, como el uracilo o la hipoxantina.

Bases alteradas

Son cambios en las bases nitrogenadas del ADN que se forman por exposición a UV, radicales *OH, radiaciones o ciertos agentes químicos. La UV provoca dímeros de pirimidinas ciclobutanos. La radiación ionizante (rayos X o gammas) puede actuar directamente depositando energía en el ADN o indirectamente, a través de radicales o iones producidos por la radiación. Algunos compuestos químicos dañan directamente. Otros deben ser activados por el metabolismo o por otros agentes. Tal es el caso del psolaren y compuestos relacionados, que al estar unidos no covalentemente al ADN, son activados por la luz. Los intermedios en los procesos oxidantes actúan sobre las bases, mientras que algunas enzimas, como las ADN metilasas o el agua, eliminan el grupo amino (NH₂) de los anillos de citosina, adenina y guanina. Esto es más frecuente en la citosina. Ciertos agentes alquilantes monofuncionales como el MMS producen alquilaciones en los O y en los N de las bases. En los N1, N3, N7 y N⁶ de la adenina, en los N1, N3, N7, N² y O⁶ de la guanina, en los N3, O² y N⁴ de la citosina y en los N3, O² y O⁴ de la timina (Fig. 1.1)(Friedberg *et al.*, 1995).

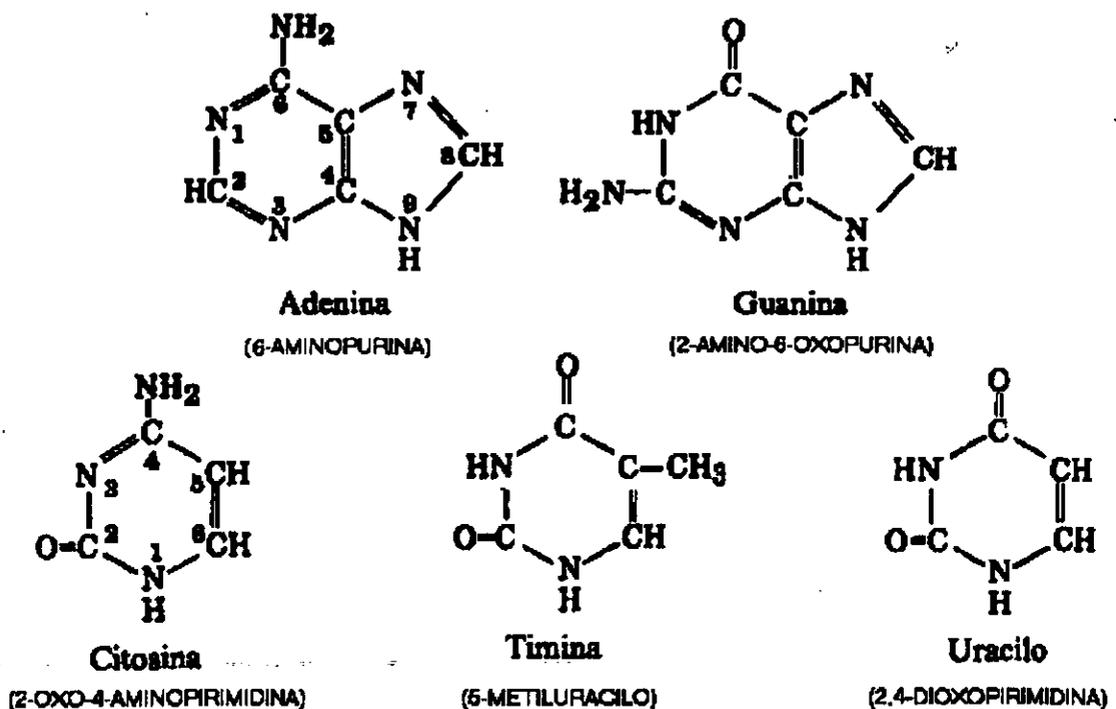


Fig.1.1. Estructuras de las principales pirimidinas, uracilo, timina y citosina y de las principales purinas, adenina y guanina.

Rompimientos sencillos (*SSBs*)

Son cortes en la unión d-ribosa y fosfato de sólo una de las cadenas del ADN. Los causan los diferentes tipos de radiación ionizante, varios agentes químicos y las nucleasas.

Rompimientos dobles (*DSBs*)

Consisten en interrupciones en ambas cadenas del ADN. Pueden ocurrir por dos eventos muy cercanos o porque uno solo, es suficiente para producirlos. La radiación ionizante como los rayos X y gamma producen radicales que inciden en dos sitios muy cercanos. Las partículas alfa y neutrones son radiaciones ionizantes densas que provocan en el agua numerosas ionizaciones. Éstas generan numerosos radicales que pueden provocar los *DSBs*.

Enlaces cruzados en el ADN

La unión de bases, azúcares o fosfatos del ADN, a través de algún compuesto químico se conoce como enlaces cruzados entre las cadenas. Pueden presentarse como monoenlaces con el ADN, puentes entre las cadenas, puentes en las cadenas y puentes con proteínas (Fig. 1.2). Estos enlaces ocurren por efecto de algunos agentes químicos como con los agentes alquilantes bifuncionales. Los puentes se forman entre los O y N de las bases púricas o pirimidicas. Si se unen a los N7 de las guaninas éstos se forman entre dos pares de bases CG/GC cercanas y en cadenas opuestas. Los N y O de las proteínas pueden ser patrones de reacción para inducir puentes ADN-proteína. Al mismo tiempo los compuestos electrofílicos mono y polifuncionales se pueden unir a los átomos de S y especialmente a los grupos -SH de proteínas y moléculas pequeñas.

Los puentes entre bandas bloquean la separación de las cadenas de ADN impidiendo la replicación y la transcripción. Los agentes como el ácido nitroso, la mitomicina, la mostaza nitrogenada, el cis-platino producen estos puentes. La UV de 254 nm y las radiaciones ionizantes pueden provocar enlaces intermoleculares en el ADN.

Los mutágenos indirectos o promutágenos deben ser activados por el metabolismo xenobiótico. A este grupo pertenecen compuestos no polares que son modificados por una familia de monooxigenasas y reductasas denominadas citocromo P-450, para hacerlos solubles y ser excretados en la orina. Algunos de los productos de este metabolismo son electrofílicos y reaccionan con los centros nucleofílicos del ADN. Ciertos componentes o contaminantes de los alimentos (nitrosaminas, aflatoxinas, y los compuestos derivados de la combustión incompleta de materia orgánica como el benzo(a)pireno, que se arrojan a la atmósfera (hidrocarburos aromáticos policíclicos), presentan estas características.

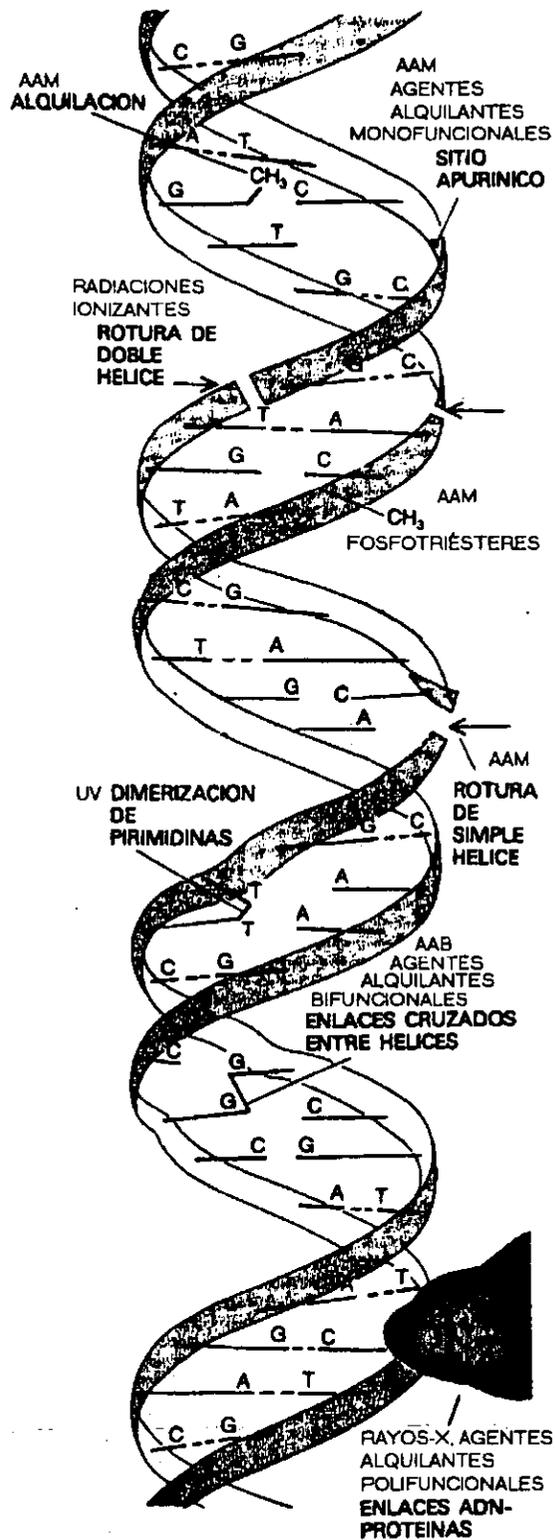


Fig. 1.2. El daño en el ADN puede implicar alquilación, sitios apurínicos (AP), dimerización de pirimidinas, enlaces cruzados entre hélices, enlaces ADN-proteínas, rotura de cadena sencilla (SSB) y rotura de cadena doble (DSB) (Modificado de Devoret, 1979).

1.4.2. Mecanismos de reparación del ADN

Los organismos vivos mantienen la fidelidad del mensaje y la integridad de la información mediante varias estrategias de reparación del daño en el ADN. Como se ha mostrado antes, el daño en el ADN puede agruparse en dos categorías principales: el que modifica las bases y el que modifica el esqueleto de azúcar-fosfato. Hay una variedad de mecanismos que permiten reconocer el daño en esta molécula y repararlo. Algunos son específicos para eventos particulares, mientras que otros son menos específicos. De acuerdo con su principal tipo de acción durante el ciclo celular mitótico, se clasifican estos mecanismos como pre-replicadores, dependientes de la fase S y post-replicadores. Ciertos mecanismos son conocidos por la alta fidelidad en la reparación, mientras que otros cometen menos errores.

Los agentes químicos pueden unirse covalentemente a las bases del ADN o causar secundariamente sitios AP. Las modificaciones simples en las bases, tales como las alquilaciones monofuncionales pueden ser reparadas directamente por alquiltransferasas, que remueven el grupo alquilo. Alternativamente tales bases modificadas pueden ser eliminadas por el sistema de escisión de bases (*BER*). Lesiones mayores, más complejas y menos específicas son eliminadas por escisión de nucleótidos (*NER*) que contiene con una gran variedad de alteraciones en las bases.

Los agentes polifuncionales pueden formar enlaces cruzados entre las cadenas o en una sola cadena. La reparación por recombinación es la más relevante para la reparación de los enlaces con el ADN.

La radiación ultravioleta (UV) causa cambios específicos en el ADN: dímeros de pirimidín ciclobutanos y (6-4) fotoproductos. Estas lesiones son reparadas por un sistema fotoreactivante de restitución directa o por *NER*.

Las *ROS* principalmente responsables del daño oxidante en el ADN parecen ser los radicales *OH. Junto con otros radicales pueden formarse internamente por el metabolismo del oxígeno en las células, especialmente bajo condiciones de estrés oxidante. Los efectos de las radiaciones ionizantes sobre el ADN pueden ser atribuidas predominantemente a la reacción del *OH con el ADN. La oxidación de esta molécula inducida por este radical es compleja, permitiendo una multitud de modificaciones al nivel de las bases y del azúcar. La mayoría de las lesiones producidas por los radicales son corregidas por el mecanismo de escisión de bases (*BER*).

La reparación de los errores en la replicación puede ocurrir por numerosos caminos bioquímicos, incluyendo la corrección de errores que acompaña a la elongación del ADN durante la síntesis y la eliminación de desemparejamientos (*MisMatchRepair*, *MMR*). El mecanismo post-replicador *MMR* es la tercera estrategia de reparación por escisión, después de los mecanismos pre-replicadores de *BER* y *NER*. Los desemparejamientos son frecuentemente producidos por la incorporación incorrecta en el ADN, de nucleótidos durante la replicación y la recombinación. La falta de balance en los bancos de nucleótidos es producida por algunos antimetabolitos de la síntesis del ADN. Tales desbalances pueden provocar un fuerte aumento de desemparejamientos. *MMR* también se ocupa de los defectos del ADN que quedan después de la replicación por translesión. Ésta es una estrategia de último recurso durante la síntesis de ADN que permite la elongación de la cadena a pesar de la presencia de daños no reparados en el molde.

Ciertos compuestos clastogénicos y los radicales libres pueden romper los enlaces fosfodiéster de las cadenas. Los *SSBs* son directa y eficientemente restaurados por la ADN ligasa o de otra manera, por mecanismos de escisión. La reparación de *DSBs*, por otro lado,

es más complicada y requiere más tiempo. La unión de no-homólogos (*non homologous end joining, NHEJ*) y la recombinación de homólogos (*HRR*) son los mecanismos principales de reparación de los *DSBs*.

Los mecanismos de reparación del daño en el ADN han sido muy estudiados en *E. coli* (Rupp, 1996), *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* (levaduras) *Caenorhabditis sp.* (nemátodo), *Arabidopsis thaliana* (planta crucífera), *Xenopus laevis* (rana), *Mus musculus* (ratón), *Rattus norvegicus* (rata), *Homo sapiens* (humanos) y *Drosophila melanogaster* (Friedberg *et al.*, 1995; Smith y Jones, 1999; Dusenbery y Smith, 1996; de Buendía, 1998; FlyBase-Listings 2001 ff.; <http://flybase.bio.indiana.edu:82/>; Med-Line 1990-2000). En todos los seres vivos se combinan ambos tipos de reparación, pre-replicadora y post-replicadora en el mismo individuo, lo cual puede producir leve sinergismo debido a que generalmente los diferentes mecanismos de post-replicación no se inhiben entre sí. Un ejemplo de esto es la relación comprobada que existe entre la escisión de nucleótidos (*NER*) con otros mecanismos de reparación como los de fotoreparación, de desemparejamientos (*MMR*) y de bases (*BER*) que aún no han sido completamente dilucidados (Tijsterman, Verhage y Brouwer, 1999).

Ha propuesto De Buendía (1988) que la pre-replicación tiene un papel evolutivamente avanzado en el mantenimiento de la fidelidad del mensaje, y considera a la post-replicación como un sistema arcaico de reparación, capaz de mantener la continuidad de las cadenas y la viabilidad celular, pero con ciertos errores.

El tratamiento con MMS ha mostrado en larvas de *D. melanogaster* que los mecanismos involucrados en la post-replicación son eliminación de desemparejamientos (*MMR*) y recombinación de homólogos (*HRR*). Dusenbery y Smith (1996) realizaron una extensa revisión de los mecanismos de reparación que han sido identificados en *Drosophila melanogaster*. De Buendía (1998) ubicó a la escisión y al mecanismo de tolerancia al daño (*SOS*) dentro de la pre-replicación, y a la recombinación dentro de la post-replicación, como los tres mecanismos principales de reparación del ADN en *Drosophila*.

Los mecanismos de reparación pueden ser abordados de acuerdo con la clasificación de Dusenbery y Smith (1996) y De Buendía (1998). Estos autores los consideran alrededor de un punto central que es el momento de la replicación. Hay más de 170 genes en *Drosophila* que intervienen en la reparación del ADN (FlyBase-Listings 2001 ff.; <http://flybase.bio.indiana.edu:82/>; Med-Line 1990-2000) pero en la mayoría de ellos los diferentes tipos de reparación y su papel no han sido suficientemente aclarados. Se han detectado como sensibles al MMS a 30 de estos genes (APÉNDICE, Tablas 1.1 y 1.2).

1.4.2.1. Reparación pre-replicadora

Los mecanismos de reparación pre-replicadora del daño (Freidberg *et al.*, 1995; Dusenbery y Smith, 1996; Rupp, 1996, De Buendía, 1998) son los siguientes:

a) Reparación directa

Los daños pueden ser corregidos por proteínas de reparación, sin ningún rompimiento del esqueleto de azúcar-fosfato y los mecanismos son:

a.1. Eliminación de grupos alquilo de las bases y de metilfosfotriésteres. Involucra dos productos de los genes clasificados genéricamente como "O⁶-MGT" que codifican metiltransferasas (O⁶-metilguanina), que transfieren estequiométricamente un grupo metilo del ADN a un residuo cisteína de la proteína.

La O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa I actúa sobre la posición O⁶ de la guanina, O⁴ de la timina y metilfosfotriésteres en el ADN. En *E. coli* esta proteína es el producto regulado del gen *ada*. En levaduras y en mamíferos la O⁶-MGT I tiene mayor afinidad por O⁶-G que por O⁴-T. Otra proteína es la O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa II, producto del gen *ogt* que es constitutivo. La O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa II remueve los metilos del O⁶ de la guanina y de la O⁴ de la timina, pero no de los metilfosfotriésteres.

En *Drosophila* se han encontrado dos polipéptidos semejantes a la O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasas I y II. La O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa I se presenta en todas las etapas del desarrollo, excepto en embriones y la O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa II sólo en larvas de primer (0-24 h de edad) y tercer estadio (72-120 h), pupas y adultos. Ambas aceptan metilos de residuos de N7-metilguanina, N3-metiladenina y O⁶-metilguanina transfiriéndolos a residuos de cisteína de la transferasa. El gen *agt* produce la "O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase" que de la misma manera que las O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasas I y II escinde los N7-G, N3-A, O⁶-G, pero además los O⁴-T.

a.2. Fotoreparación de lesiones por UV

Este proceso depende de la luz y consiste en dos eventos:

Una monomerización catalítica de los dímeros ciclobutanos-pirimidina por medio de una enzima fotorreparadora. La enzima actúa sobre los dímeros de pirimidina generados por la UV y regenera las dos bases originales. Esta enzima es un monómero de 54 kDa. Tiene dos cofactores no covalentes que son también cromóforos, el FAD reducido (FADH-) y el metenil-tetra-hidrofolato (MTFH). La enzima se pega al ADN en la oscuridad. La luz de 350 a 500 nm activa al metenil-tetra-hidrofolato que absorbe un fotón (MTFH*) y lo pasa al FAD reducido. Este FADH* monomeriza el dímero por transferencia del electrón al dímero (cicloeverción). Sucesivas transferencias de electrones restauran las pirimidinas y regeneran la forma original de la enzima (Fig. 1.3). En *Drosophila melanogaster* el gen *phr* produce la enzima "photorepair" homóloga en el pez dorado (*Carassius*) y en el opossum (*Monodelphis*). Esta enzima no se ha encontrado en mamíferos en los que *NER* se encarga de eliminar a los dímeros de pirimidina.

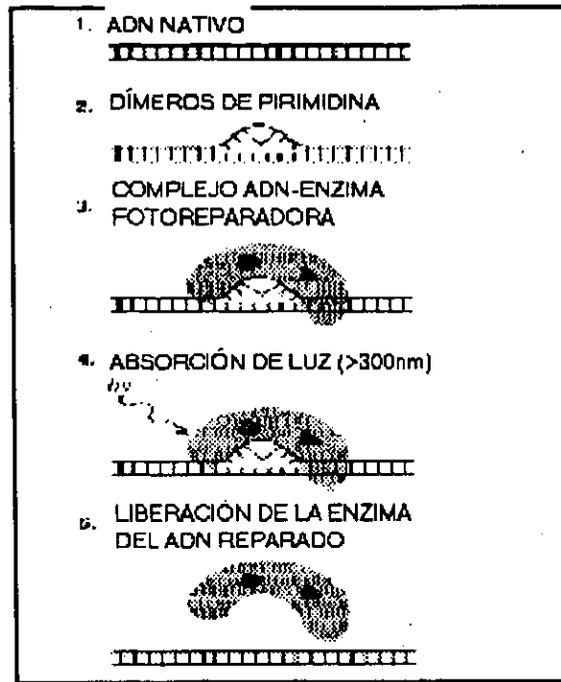


Fig. 1.3. La fotoreparación del ADN se realiza por una enzima que actúa sobre los dímeros de pirimidina generados por la UV y regenera las dos bases originales (Modificado de Friedberg *et al.*, 1995).

Las lesiones (6-4)pirimidin / pirimidonas se originan por acción de la luz UV, de la siguiente manera (Frei, comunicación personal):

1. Se establece un anillo lábil de cuatro carbonos entre las dos pirimidinas adyacentes
2. Las esquinas del anillo son el C5 y C6 de la 5' pirimidina y el C4 y O⁴ de la 3' timina o el C4 y el N⁴ de la 3' citosina.
3. Cuando el anillo inestable se rompe se establece un puente simple entre el C5 y el C6 de la 5' pirimidina y otro puente que une el C6 al C4 de la 3' pirimidina.
4. Se forma un puente estable entre el C6 de la 5' pirimidina y el C4 de la otra pirimidina
 - a) Si la 3' pirimidina es timina entonces su O⁴ se transfiere como grupo OH al C5 de la 5' pirimidina
 - b) Si la 3' pirimidina es citosina (lo más común) entonces su N⁴ se transfiere como grupo amino al C5 de la 5' pirimidina.

La reparación de estas lesiones se ha demostrado en embriones y ovarios de *Drosophila melanogaster* donde el gen *phr6-4* codifica una enzima denominada "(6-4)photolyase" que funciona como fotoliasa, depende de la luz y reacciona con los (6-4)productos.

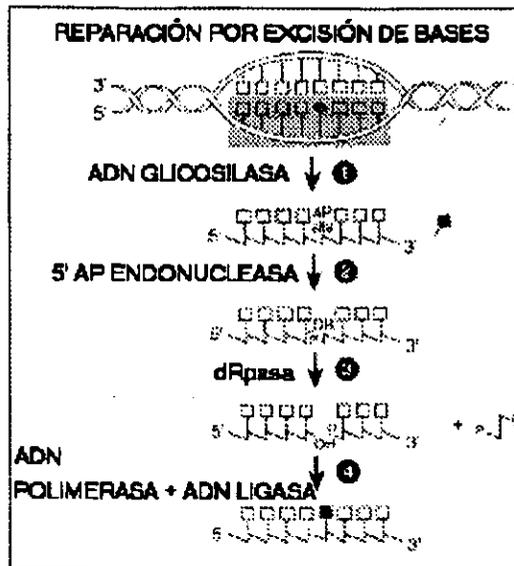


Fig. 1.4. En BER intervienen glucosilasas, endonucleasas, exonucleasas, polimerasas y ligasas (Modificado de Friedberg *et al.*, 1995).

b) BER: Reparación por escisión de bases

En BER las glucosilasas eliminan las bases alteradas o incorrectas dejando un sitio AP. La reparación de estas lesiones continúa con la actividad de endonucleasas AP que catalizan el corte del ADN en los sitios AP, preparando el ADN para la escisión, síntesis y unión de la cadena. Se han identificado dos clases de enzimas para el primer paso de este tipo de reparación:

b.1. Glucosilasas simples que remueven la base y forman un sitio AP.

b.2. Glucosilasas que remueven la base y además están asociadas a una actividad endonucleasa por lo que cortan el enlace fosfodiéster en el sitio AP. A estas enzimas se les conoce como liasas AP.

b.1. Glucosilasas simples

En este mecanismo de reparación la base dañada es eliminada por una ADN-N-glucosilasa que corta el enlace N-glucosídico entre la base nitrogenada y la estructura azúcar-fosfato. El sitio AP que queda es cortado en la cadena azúcar-P por una AP-endonucleasa o por una AP-liasa y/o dRpsa. El espacio vacío es llenado por una ADN polimerasa y unido por ligesas (Fig. 1. 3). Las variaciones y especificidades dependen del tipo de glucosilasa que inicie el proceso. Algunas son muy específicas como la uracil ADN-glucosilasa (*Uracyl DNA glycosilase*) y otras pueden reparar diferentes bases (3-MeA-ADN glucosilasa I y II, *FaPy*-glucosilasa, 8-oxoguanina-ADN-glucosilasa, glucosilasa-timina-específica y endonucleasa III).

Uracil-ADN-glucosilasa (Uracyl DNA glycosilase)

En procariontes la uracil-ADN-glucosilasa es producto del gen *ung* que elimina el uracilo que se produce por desaminación de la citosina. Es una enzima específica para el sustrato y carece de la actividad AP-endonucleasa. En *Drosophila melanogaster* el gen *udg* codifica para esta enzima. La presencia de uracil-ADN-glucosilasa o glucosilasas para bases metiladas fue cuestionada en *Drosophila* porque existían datos contradictorios (Dusenbery y Smith, 1996). Smith y Dusenbery (1989) reportan en *Drosophila* que hay corrección de O⁶-MeG en todas las fases del desarrollo, excepto en embriones y no existen diferencias entre la

actividad en hembras y machos. Guzder *et al.* (1991) encontraron que esta enzima no se produce si el agente alquilante se proporciona en cantidades subletales. En este insecto se ha identificado el gen *agt* que codifica a la O⁶-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa, la cual repara a la O⁶-MeG y a la O⁴-MeT en el ADN dañado con MMS (Kooistra *et al.*, 1999). Deutsch y Spiering (1982) identificaron una nucleasa específica para el ADN con uracilo (A:U, G:U) sólo en el III estadio larval (72-120 h) de *Drosophila*. Morgan y Chlebeck (1989) la describen sólo en huevos y larvas de III estadio. Se ha explicado su ausencia en la pupa estableciendo una relación de la metamorfosis con la apoptosis (Deutsch, 1995). El gen *BcDNA:LD19945/Ogg1* codifica la 8-oxoguanina-ADN-glucosilasa (*8-guanine DNA glycosylase*) y el gen *Thd1* produce la G/T glucosilasa-timina-específica/ endonucleasa III (*G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase*).

b.2. Glucosilasas con actividad asociada de endonucleasas AP(liasas-AP) y dRpasas

Las liasas son enzimas con actividad glucosilasa y endonucleasa. Debido a que realizan ambas actividades se les denomina liasas-AP (Clase I). Estas enzimas eliminan la base alterada generando un sitio AP. Al cortar en 3' del sitio AP, dejan un extremo 5'-fosforil y un 3'-desoxirribosa-5-fosfato (3'-ddR5P) que no puede ser utilizado por la ADN polimerasa I para iniciar la síntesis. Este residuo 3' es eliminado por las desoxi-ribo-fosfodiesterasas (dRpasas) para que la ADN polimerasa pueda iniciar la síntesis.

En *E. coli* las glucosilasas *FaPy* (MutM) y la endonucleasa III tienen actividad asociada de endonucleasa AP que elimina la mayoría de las lesiones producidas por los oxidantes (Rupp, 1996). La G/T glucosilasa-timina-específica actúa como una glucosilasa en los derivados de pirimidina con anillos que están saturados, contraídos o modificados, como la timina glicol y otras 5,6-dihidropirimidinas.

Las proteínas con verdadera actividad endonucleasa AP cortan en el sitio 5' AP al hidrolizar la unión 3'-O-/P-O-5'-AP dejando un extremo 3'-OH-nucleótido y uno 5'-desoxirribosa-5'-fosfato (5'-dR5P). Se les conoce como endonucleasas 5' AP. El extremo 3'-OH-nucleótido sí puede servir para el inicio de la síntesis del ADN. Entre las AP-endonucleasas más activas en *E. coli* encontramos a la exonucleasa III y la endonucleasa IV.

Exonucleasa III de E. coli

La exonucleasa III fue reportada previamente como endonucleasa II o VI de *E. coli*. Esta enzima es una exonucleasa 3'→5' que requiere para actuar de un extremo 3'-OH en el ADN de doble cadena. También tiene una actividad fosfatasa por lo que puede atacar indistintamente un extremo 3'-OH (como exonucleasa) o 3'-P (como fosfatasa). Además esta enzima puede degradar híbridos ADN-ARN por lo que tiene una actividad RNAasa-tipo H. Ahora se sabe que la mayor actividad de esta enzima es la de endonucleasa 5' AP. Esta enzima requiere de Mg²⁺ para esta última actividad y la adición de un quelante como el EDTA inhibe su actividad completamente.

Se ha propuesto que tiene un sitio activo que cataliza todas las actividades y tres dominios en la molécula: uno que reconoce el sitio AP en el ADN, otro que se une a la cadena dúplex del ADN y un tercero con actividad catalítica que corta los enlaces fosfodiéster en una cadena del dúplex ADN

Endonucleasa IV de E. coli

Esta enzima es otro ejemplo de -endonucleasa 5' AP que deja extremos 3' OH. Pero además tiene actividad exonucleasa y endonucleasa de ciertos residuos (desoxirribosa-5-P y residuos de urea respectivamente). Sólo difiere de la ExoIII en que no tiene actividad exonucleasa 3'→5'. Su inactivación con EDTA sugiere la presencia de iones metálicos unidos a la molécula funcional. Se ha comprobado la presencia de Zn^{2+} y Mg^{2+}

b.3. Exonucleasas

En *E. coli* los sitios AP pueden ser reparados por exonucleasas que eliminan el residuo abásico 5'-fosforil por una de dos exonucleasas: la exonucleasa III o la endonucleasa IV. Estas son las enzimas más activas adentro de la célula.

En *Drosophila* se ha detectado una proteína Rrp1 homóloga en su región C-terminal a ExoIII de *E. coli* en un 33% y con mayor proporción de actividad 3'-reparadora que Exo III. Esta proteína unida a Mn^{2+} en el residuo Glu-461 y a dCMP tiene un sitio catalítico conservado de manera absoluta en la familia Exo III. Cualquier cambio en este sitio de unión al metal o en otros 3 residuos (Asp-644, Asp-669, His-670) disminuye la actividad de la enzima. Realiza funciones de 3' fosfodiesterasa, 3' exonucleasa y 3' fosfatasa. El extremo N-terminal tiene actividades de reparación HRR. Además interviene en la reparación del daño por ROS y por agentes alquilantes. No se conocen mutantes de este gen.

Dos endonucleasas han sido clonadas en *Drosophila*, la "ribosomal protein P0" producida por el gen *RpPo/AP3/PO* y la "ribosomal protein S3" del gen *RpS3*. Ambas funcionan como proteínas ribosómicas y con actividad liasa-AP *in vitro*, excluyendo las bases 8-oxoG. *RpS3* es además una proteína multifuncional que corta como endonucleasa el sitio AP por 3' en un mecanismo dependiente de Mg^{2+} y funciona como dRpasa en el extremo 5'. Las "apurinic/apyrimidic endonucleases I and II" codificadas por los dos genes *Apl* y *AplI* cortan en los sitiosapurínicos 3' por lo que se pueden considerar liasas-AP. Sin embargo la *Apl* deja en el sitio AP un extremo 3' fosforil y 5' OH, por lo que se considera una verdadera y novedosa 3' AP endonucleasa (Friedberg *et al.*, 1995). La existencia de estos dos genes se considera tentativa.

b.4. Reparación por escisión de bases (BER) de los daños por estrés oxidante

La mayor parte de las lesiones producidas por el estrés oxidativo en las bases del ADN (Fig. 1.4) son reparadas por BER. El metabolismo que depende del oxígeno se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares, cáncer, degeneración neuronal, disfunción de la inmunidad y envejecimiento. Sin embargo, las células contienen sistemas de reparación que las protegen del estrés oxidante. Los daños son eliminados en su mayoría por glucosilasas que remueven las lesiones ADN-formamidopirimidina (*FaPy*), 8-hidroxiguanina y timina-glicol (Friedberg *et al.*, 1995).

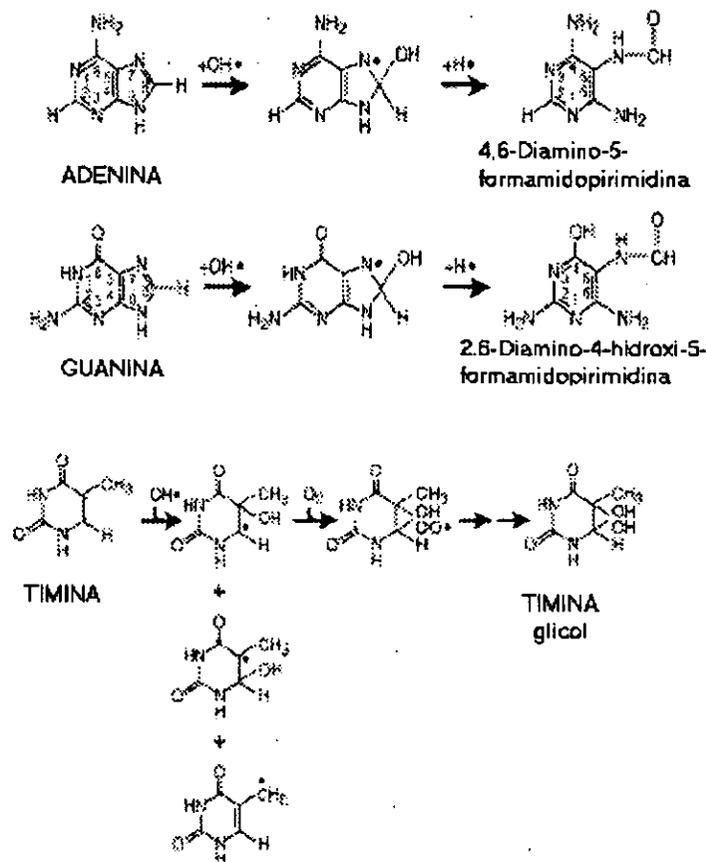


Fig. 1.5. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) alteran las bases produciendo timina-glicol en lugar de la timina y diamino-formamido-pirimidinas en vez de adenina o guanina (Modificado de Friedberg *et al.*, 1995).

ADN-formamido pirimidina glucosilasa (FaPy)

En *E. coli* la ADN-formamido pirimidina glucosilasa es producida por el gen *fpg+*. La proteína es pequeña, no presenta homología con otras glucosilasas excepto la del fago T4 y también repara a las 8-hidroxiguaninas. Tiene un motivo "Zn finger" indispensable para realizar su función. Sus mutantes no son sensibles a agentes alquilantes o radiaciones. Esta proteína corta los sitios AP dejando extremos 5' y 3' fosforil y una abertura en la cadena. Sólo repara ADN de una cadena y por lo tanto el ADN doble con sitios AP no es reparado por esta glucosilasa. Se ha comprobado que esta proteína es idéntica a MutM⁺ que repara las lesiones 8-oxoguaninas, cuyo mutante provoca el aumento de transversiones G*C → T*A. En células de mamífero se ha comprobado que la proteína FaPy de ratón también remueve 8-hidroxiguaninas (Friedberg *et al.*, 1995). En *Drosophila* el gen *Rps3*, homólogo a *fpg+* de *E. coli*, codifica una proteína con actividad de endonucleasa AP en 8-oxoguaninas, cortando el extremo 3' del sitio AP con un mecanismo dependiente de Mg²⁺ y actividad dRpsa en 5'. El mutante de este gen es *minute* y es letal en homocigotos.

Reparación GO (8-hidroxiguaninas)

En procariotos las guaninas oxidadas favorecen las transversiones G*C → T*C. Las guaninas oxidadas provocan la colocación de adeninas (8-oxoG*A) al replicarse el ADN cuando no son reparadas por el sistema GO. Éste incluye dos glucosilasas: MutY (adenina-glucosilasa- liasa AP) y MutM (glucosilasa *Fapy*) y además una 8-oxodGTPasa, llamada MutT.

La reparación sigue tres caminos (Fig. 1.6):

1. MutT convierte a la 8-oxodGTP en un monofosfato antes de que sea incorporado al ADN o lo elimina del almacén de nucleótidos.
2. MutM repara los 8-oxoG que se hayan producido en el ADN transformándolos en guanina
3. Si a una banda con 8-oxoG se le añade una adenina, MutY con función editora remueve la base incorrecta y coloca una citosina frente a la 8-oxoG (8-oxoG*C)
4. MutM transforma la 8-oxoG en guanina y queda el par de bases correcto G*C (Rupp, 1996).

En *Drosophila* se han determinado dos proteínas que reparan las 8-oxoguaninas. El producto del gen *BcDNA LD19945/Ogg1* es una 8-oxoguanina ADN glucosilasa. El producto del gen *RpS3* que es multifuncional, también actúa como glucosilasa reparando las 8-oxoguaninas.

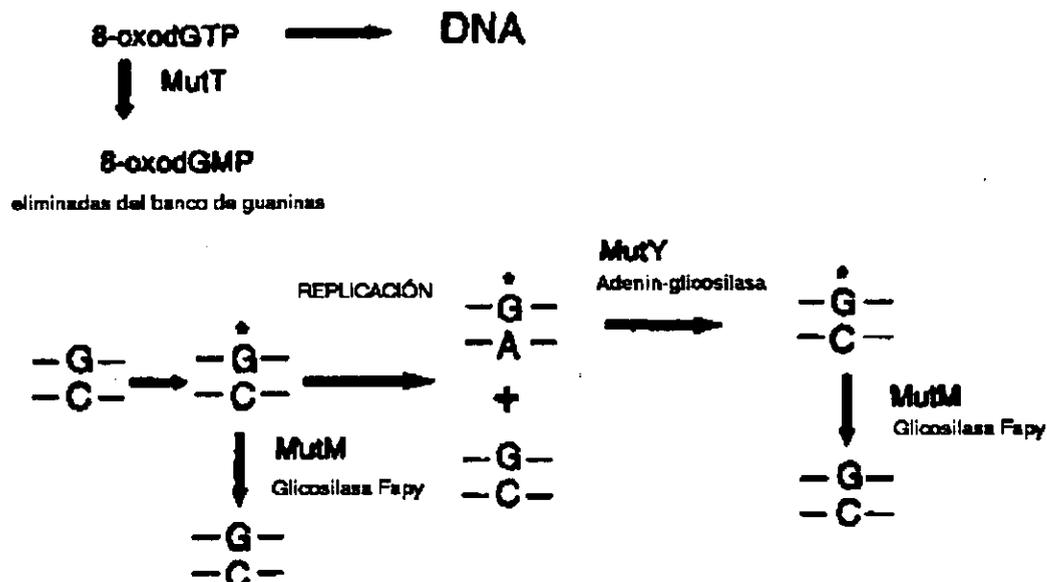


Fig.1.6. La reparación de las guaninas oxidadas implica la acción de diferentes enzimas ya que el daño puede presentarse en el banco de guaninas y en la doble cadena de ADN, antes y después de la replicación (Modificado de Rupp, 1996).

Glucosilasa-timina-específica

La proteína glucosilasa-timina-específica reconoce residuos de pirimidina que han sido dañados por saturación, fragmentación o contracción del anillo, tales como: timina-glicol, 5,6-dihidrotimina, urea y otros. En un principio se le denominó endonucleasa III, pero actualmente el otro nombre mencionado es el más aceptado. En *E. coli* el gen *nth* la produce y consiste en una proteína hierro-sulfurada con un grupo $(4Fe-4S)^{2+}$. Sus mutantes no son sensibles a radiaciones gamma o al H_2O_2 , pero sí se consideran genes mutadores. Corta en el

sitio 3'-AP y se han encontrado proteínas semejantes en *M. luteus*, células bovinas y humanas (Friedberg *et al.*, 1995). En *Drosophila* el gen *Thd1* produce esta proteína que es similar en el humano, ratón y levaduras.

c. NER: reparación por escisión de nucleótidos

La reparación por escisión de nucleótidos se realiza con la participación de nucleasas, helicasas, polimerasas, factores de transcripción, cinasas y ligasas (Fig 1.7). En mamíferos es semejante al sistema UvrABC de procariontos, aunque no se conocen todos los detalles del mecanismo (Friedberg *et al.*, 1995). Se han descrito dos modos de funcionamiento de esta escisión en eucariotos: la reparación acoplada a la transcripción y la reparación global del genoma. Si estos no ocurren o se repara mal, se produce una pérdida de hasta 50 pares de bases, formándose sitios AP cuyos efectos biológicos causan toxicidad aguda con muerte celular o del organismo, efectos crónicos a largo plazo por mutagénesis o carcinogénesis. Se han identificado 25 proteínas que participan en este tipo de reparación y forman complejos entre ellas, por lo que las interacciones hidrofóbicas y de cargas de fosfatos entre ellas, son importantes para el reconocimiento de la lesión (Lehman *et al.*, 1996; Naegeli, 1999). Los genes que la regulan se conocen en *E. coli* como genes *uvr*, en *S. cerevisiae* como genes *rad* del grupo *rad3* y en humanos como los *XP*. En *Drosophila* están representados principalmente por los genes que son similares a los genes de otros eucariotos, tales como *mei-9*, *mus201*, *hay* y *mus210* (Dusenbery y Smith, 1996).

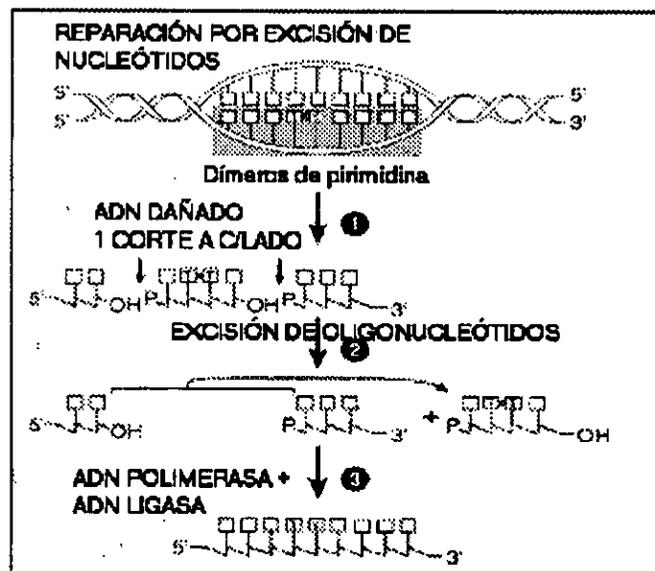


Fig. 1.7. La reparación por escisión de nucleótidos corta el oligonucleótido en ambos lados de la región en donde está la base alterada, polimeriza el segmento faltante y cierra la doble cadena con una ligasa (Modificado de Friedberg *et al.*, 1995).

c.1. El sistema UvrABC (NER) en procariotos

En procariotos la reparación por escisión de nucleótidos es iniciada por el complejo de nucleasas UvrABC que repara diferentes daños con distintas características químicas y estructurales, sobre todo a aquellos que provocan graves distorsiones en el ADN. Se sugiere actualmente que UvrABC es un modelo de cómo NER es capaz de reparar cualquier daño de la misma manera en procariotos y eucariotos. El complejo nucleasas UvrABC hace un corte doble en la banda lesionada que es reparado por ADN polimerasas y ligasas.

En síntesis, el modelo en procariotos es el siguiente (Fig. 1.8):

1. La UvrA forma un dímero UvrA2 que interacciona con UvrB y constituye el complejo UvrA2B. La UvrA2 o el dímero UvrA2B se pegan a sitios inespecíficos del ADN
2. El dímero o complejo se mueve en cualquier sentido y pliega la cadena
3. El pliegue del dímero reconone la lesión y forma un vértice más estable
4. Se requiere la actividad de una helicasa dependiente de ATP para exponer el interior hidrofóbico del ADN y determinar si la lesión está presente y para que UvrB se ensamble apropiadamente en un complejo de pre-incisión.
5. UvrC interacciona con UvrB. UvrB hace la primera incisión en el lado 3' de la lesión a unos 3-4 nucleótidos de la lesión.
6. Un cambio en la conformación del complejo UvrBC se presenta antes del segundo corte en 5' a cargo de UvrC y a unos 7 nucleótidos de la lesión.

UvrA tiene múltiples dominios de interacción con los nucleótidos. UvrB presenta una actividad ATPasa asociada con una actividad helicasa limitada del complejo UvrA2B. La mutación *uvrB* inhibe la actividad helicasa e impide la formación del complejo de iniciación con el daño, pero no impide la formación del dímero UvrA2 ni su unión con el ADN no dañado. Se ha sugerido que esta actividad de helicasa dependiente de ATP, permite que el complejo se una al ADN en búsqueda de lesiones, aunque la extensión de oligonucleótidos que puede eliminar es limitada. Si UvrA2B encuentra un desemparejamiento, este daño raramente es eliminado por este sistema (Rupp, 1996).

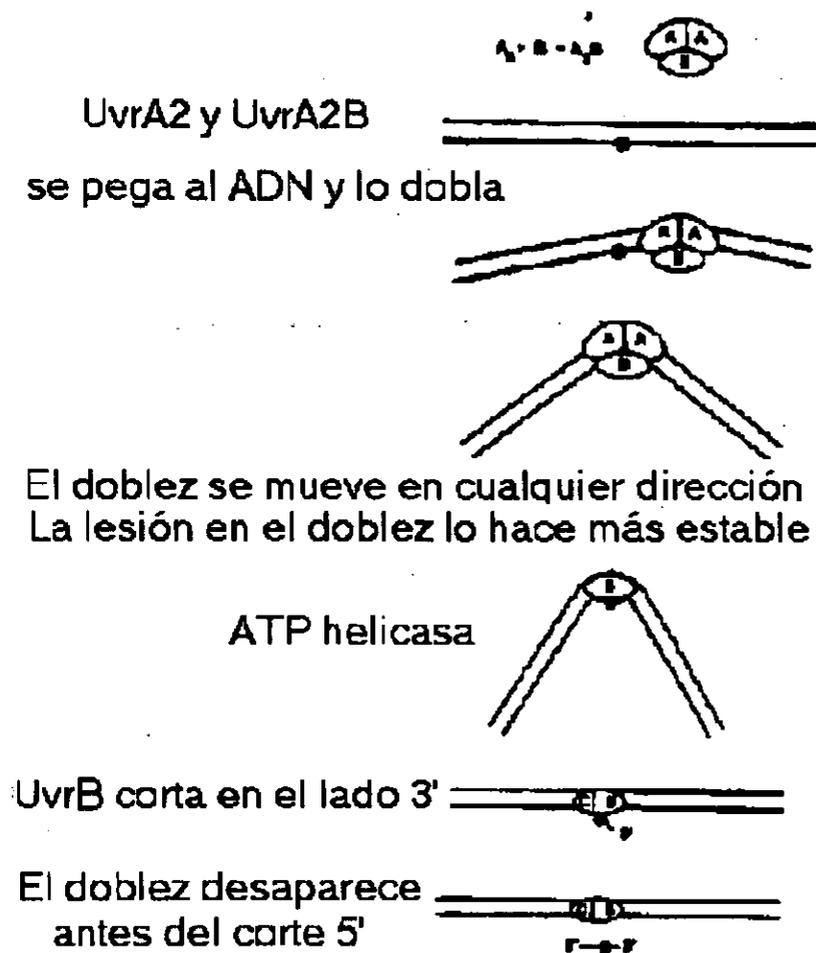


Fig.1.8 Mecanismo de escisión de nucleótidos (NER) con el complejo UvrABC de *E. coli* (Modificado de Rupp, 1996).

c.2. NER en levaduras, humanos y en *Drosophila melanogaster*

El estudio de NER en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y en *Schizosaccharomyces pombe*, ha permitido identificar unos 30 loci RAD (*radiation sensitivity*) que les confieren resistencia a la luz UV o radiaciones. Estos se han clasificado en tres grandes grupos epistáticos que reflejan tres fundamentales respuestas celulares al daño en el ADN. Los grupos son: RAD3, RAD52 y RAD6 (APÉNDICE, Tabla 1.3). El grupo RAD3 implica una hipersensibilidad a la luz UV que produce anillos ciclobutanos y (6-4)fotoproductos y a los agentes químicos que producen aductos. La mayoría de los mutantes de este grupo son deficientes en la reparación de daños por UV, por lo cual la mayoría participa en NER. El grupo RAD52 pertenece a los genes que son deficientes en reparación post-replicadora por recombinación mitótica y/o meiótica de DSBs inducidas por radiaciones ionizantes y en la reparación de los daños por UV que no fueron reparados por NER. El grupo RAD6 incluye genes involucrados en la reparación post-replicadora que es respuesta a los errores cometidos durante la "translesion synthesis", al daño por luz UV, rayos X, agentes alquilantes y productores de enlaces cruzados. Sus mutantes muestran hipersensibilidad a estos agentes y aumento de mutaciones.

El gen *RAD6* facilita la formación de complejos multiproteicos y produce una enzima E2 que cataliza la transferencia de una ubiquitina a las histonas H2A y H2B e interviene en la degradación de proteínas. Esto parece tener relación con la conformación de la cromatina, ya que la separación del ADN de las histonas, permite mejor acceso de estos sistemas multiproteicos reparadores (Friedberg *et al.*, 1995).

En mamíferos se ha demostrado *in vitro* que se requieren seis factores proteicos para que se realice *NER*: XPA, RPA, XPC-HHR23B, TFIIH, XPF-ERCC1 y XPG para integrar los componentes del *core* de *NER* e inducir la escisión de nucleótidos. Lo anterior sugiere la participación de un complejo nucleoproteico con una serie de interacciones ordenadas entre sus distintos factores. La adición de ADN polimerasa épsilon, PCNA y RFC permite el llenado de los espacios y la ADN ligasa I une los extremos de la cadena. Esto permite la reparación en las cadenas que no están transcribiéndose y actualmente se le denomina reparación global del genoma. En las cadenas que se están transcribiendo se realiza una reparación acoplada a la transcripción en la que participan las proteínas de *NER*, la ARN polimerasa II, los factores de acoplamiento CSA, CSB/ Rad26 y el factor de transcripción TFIIH en un sistema que conforma un complejo multiproteico llamado Reparosoma. Las homologías entre *S. cerevisiae*, *Homo sapiens* y *Drosophila melanogaster* para los genes cuyos productos forman el Reparosoma (Friedberg *et al.*, 1995) se muestran en el APÉNDICE, Tabla 1.4.

Las diferentes acciones que se requieren para completar *NER* y los genes o productos que intervienen en ellos son las siguientes (Naegeli, 1999):

1. Reconocimiento de la lesión y ensamblaje de nucleoproteínas: *Xpac/hXPA/Rad14*
2. Reconocimiento de la lesión y unión a la cadena de ADN en donde está el daño: *RpA* (integrado por los productos de *RpA-70*, *RpA-30* y *RpA8*)/*rpa1/rfa1*
3. Unión al ADN, e interacción con TFIIH y la proteína Rad23: *mus210/hXPC/Rad4*
4. Unión al ADN para ¿estabilizar el complejo e incidir sobre la cromatina?: *Rad23/HHR23B/Rad23(S. cerevisiae homologE)/Rad23*
5. Helicasas, *Zn-finger*, interacción con p53 y regulación del ciclo celular: TFIIH, compuesto por los productos de *p89/XPB/ERCC3*, *p80/XPD/ERCC2*, *p62/TI·B1*, *p52/TFB2*, *p44/SSL1*, *p38/cdk7/MO15*, *p37/cyclin H*, *p36/MAT1* y *p34*.
6. Unión específica al sitio 5', endonucleasa 5' e interacción con XPA: *mei9/hXPF/Ercc4/Rad1* y *Ercc1/ERCC1/Rad10*
7. Unión específica al sitio 3', endonucleasa 3' e interacción con RpA, TFIIH y PCNA: *mus201/XPG/ERCC5/Rad2*
8. Reconocimiento del *primer* e hidrólisis de ATP por una ATPasa dependiente del ADN que facilita la unión de PCNA al ADN: *Rfc*
9. Enlace de la ADN polimerasa a la región que se está reparando: *mus209/PCNA/POL30*
10. Síntesis de la cadena complementaria y función editora: *DNA pol-epsilon/DNA polymerase epsilon catalytic polypeptide/POL2*
11. Ligasa e interacción con PCNA: *CG5602/DNA ligase I/cdc9*

Reconocimiento del daño y endonucleasas

En *Drosophila* se ha clonado el gen constitutivo *Xpac*, semejante a *Rad14* de *S. cerevisiae* y *UvrA* de *E. coli*. Interviene en el reconocimiento de la lesión. Su proteína tiene un motivo "Zn-finger" que se une a un espacio mayor de la cadena porque reconoce secuencias específicas de los nucleótidos. Se expresa de manera diferente durante el desarrollo de la mosca y es más abundante en el tórax y abdomen que en la región cefálica. En humanos XPA interacciona con RpA, TFIIH y ERCC1

En mamíferos XPC forma un heterodímero con HHR23B (homólogo de Rad23 en *S. cerevisiae*) que se une al ADN dañado. En *Drosophila* el gen *mus210* (*DmXPC/mus212*) controla la reparación *NER* de todo el genoma (Lehman *et al.*, 1996). Se encarga de unirse al ADN y tiene una actividad endonucleasa muy reducida. Se propone que se uniría al producto Rad23 el cual tiene una actividad chaperona que facilita el complejo multiproteico y tiene un dominio ubiquitina. Este dominio es el que marca a las proteínas que serán hidrolizadas en el Proteosoma.

El gen *mei-9* (*DmXPF/mus110*) homólogo de *Rad1* en *S. cerevisiae* y de *uvrABC* en *E. coli*, regula a una endonucleasa que corta en el lado 5' de 16 a 25 enlaces fosfodiéster y los extremos 3' del ADN recombinante meiótico. Es muy sensible a mutágenos, inclusive a la UV. Muestra severa deficiencia en *NER* y en la recombinación meiótica. El gen silvestre produce la proteína en embriones y adultos y repara a los desemparejamientos (*MMR*) dependiendo del tipo de parejas de bases (Bhui-Kaur *et al.*, 1998). Funciona normalmente junto con la proteína Ercc1/RAD10 codificada por una región del genoma homóloga a *ERCC1*.

Los genes *mus201* (*dmXPG*) y *ERCC1/Rad10* producen subunidades TFIIH con actividad endonucleasa 3' y 5' respectivamente. Los productos Rad1/Rad10 reconocen el daño gracias al producto *Xpac* (*Rad14*) para formar el reparosoma (Lehman *et al.*, 1996).

Helicasas (exonucleasas dependientes de ATP)

El papel del factor de transcripción TFIIH de humanos demostró que participa en la promoción de la transcripción por la ARN polimerasa II y en la reparación *NER*. Este factor es un complejo multimérico y multifuncional que posee actividad ATPasa dependiente del ADN, ADN helicasa 5'→3' y 3'→5' y actividad cinasa. Regula el inicio de la transcripción al fosforilar a la ARN polimerasa II para que pueda desprenderse de los factores de transcripción e iniciar la elongación. También interviene en *NER* y en la regulación del ciclo celular (complejo cdk7-ciclina H- MAT1) desencadenando cascadas en respuesta al daño en el ADN, lo cual detiene el ciclo celular hasta que esta molécula es reparada (Naegeli, 1999).

El gen *haywire* (*dmXPB/Ercc3*) en *Drosophila* origina la subunidad TFIIH de una helicasa 3'→5', es constitutivo durante todo el desarrollo a niveles bajos e interacciona con la beta tubulina del citoesqueleto.

El gene *XPD* (*dmXPD/ERCC2*) produce la subunidad TFIIH de una helicasa que elimina en dirección 5'→3' el sitio dañado. Tiene además actividad ATP dependiente con respecto al ADN de una sola banda, en presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺.

ADN polimerasas

En eucariotes hay 4 polimerasas que participan en la síntesis del ADN: alfa, beta, gamma y épsilon. Las polimerasas alfa y delta intervienen en la elongación de las cadenas, beta interviene exclusivamente en la reparación del ADN, gamma en la replicación mitocondrial y épsilon interviene en *NER*. La única que no interviene en la replicación semiconservadora es

la beta. Ésta actúa llenando los espacios dejados en el inicio de la reparación del uracilo por *BER*.

Se ha detectado, que la metil-nitroso-guanidina (MNNG) induce la expresión de la polimerasa beta y su promotor. Para lo cual se requiere AMPc en la región CRE del promotor, una cinasa A y una proteína (CREB) que se une al promotor y necesita ser fosforilada (Narayan *et al.*, 1996). Las polimerasas delta y épsilon tienen además una función editora que aumenta la fidelidad de la síntesis por reparación. Se sabe que la polimerasa épsilon es indispensable para que *NER* se efectúe *in vitro*. En *Drosophila* se han purificado subunidades de las polimerasas alfa, beta (gen *DNApol-eta*), gamma, épsilon (gen *DNApol-epsilon*) y un tipo de polimerasa llamada zeta que interviene en la reparación después de la "translesion synthesis".

Polimerasa PCNA

En células humanas la PCNA "*proliferating cell nuclear antigen*" tiene forma de anillo y está compuesto por tres péptidos idénticos. Rodea al ADN y estimula la unión de las polimerasas delta y/o épsilon. En *Drosophila* la proteína PCNA es producto del gen *mus209/DmPCNA*. Esta proteína une las polimerasas al ADN para llenar los espacios vacíos de la hebra permitiendo la reparación del daño y es indispensable para la reparación de los *DSBs*. Es constitutiva, se expresa ampliamente en ovarios, óvulos no fertilizados y embriones tempranos por lo que se considera de control materno.

Proteínas RP-A y RPC

Las proteínas RP-A (*replication protein A*) y RPC son necesarias para completar la resíntesis del ADN durante la reparación por *NER*. En humanos la proteína RPA es esencial para la replicación, *NER*, *MMR* y recombinación. Está formada por tres polipéptidos de 14, 34 y 70kD que se unen al ADN de una sola banda, que previamente fue abierto por las helicasas (Naegeli, 1999). En *Drosophila* la proteína DmRP-A se ha purificado en embriones y los genes que la codifican no se han identificado. Los productos de los genes *RpA-8*, *RpA-30* y *RpA-70* integran a la proteína Rp-A. Se unen a las cadenas simples e intervienen en la reparación por recombinación. El producto del gen *Rfc40* es un factor de replicación que contiene un dominio DAED-box de helicasa ATP dependiente y que es homólogo en 68% de sus aminoácidos a la proteína humana RPC.

Ligasas

Las ligasas se han aislado de embriones de *Drosophila* y son de dos tipos: la ligasa I con periodos de replicación altos e intermitentes y la ligasa II con replicación baja y persistente durante todo el desarrollo. La región N-terminal de la ligasa I es fosforilada por la caseína-cinasa II codificada por el gen *Ckl1alpha (CKII)* (Prigent *et al.*, 1992).

1.4.2.2. Fidelidad de la síntesis del ADN (función editora durante la replicación)

a) Prevención de errores

a.1. Selección de nucleótidos

Las ADN polimerasas III y I de procariontes o las ADN polimerasas alfa, delta y gamma en eucariontes capturan un nucleótido trifosfato, lo escinden a monofosfato y lo agregan a la cadena naciente, en un evento energéticamente favorable al nucleótido correcto.

a.2. Revisión del nucleótido añadido y expulsión si no es el complementario

Las mismas ADN polimerasas se asocian a una actividad exonucleasa editora. Si no es el nucleótido correcto, se invierte la reacción y éste vuelve a hacerse trifosfatado.

1.4.2.3. Reparación post-replicadora

Este tipo de reparación se ha estudiado intensamente en células irradiadas con UV. Es tan importante que una mutación doble en *uvrA* (*NER*, reparación pre-replicativa) y en *recA* (*HRR*, reparación post-replicativa) produce la muerte de una célula con una sola lesión / cromosoma. Dentro de este grupo se incluyen algunos mecanismos de tolerancia al daño, que no son estrictamente reparación del daño, como la síntesis sin corrección de errores. Después de la irradiación con UV la síntesis continúa a niveles bajos (horas, minutos) y cada horquilla que avance en el dúplex encontrará alrededor de 1000 pares de bases por seg, lesiones en la banda, que son replicadas por la reparación deficiente que se conoce como translesión.

Esta síntesis producirá ADN con desemparejamientos o numerosas *SSBs* o *DSBs* que son reparadas directamente por ligasas o por recombinación de homólogos (*HRR*). La *HRR* permite que una o dos aberturas sean llenadas por la proteína *RecA* que transfiere la banda complementaria del dúplex en la abertura. Los desemparejamientos son eliminados por corrección errores (*MMR*) (Rupp, 1996).

a. Tolerancia a los defectos durante la síntesis o translesión

En procariotos la mayoría de las mutaciones que se producen por daño en el ADN se presentan porque ocurre un mecanismo especial de tolerancia, que realmente no repara al ADN. Este mecanismo llamado translesión hace que una ADN polimerasa inserte un nucleótido incorrecto frente a una lesión y continúe la síntesis (Rupp, 1996). En *E. coli* se ha observado que esta respuesta está controlada por dos proteínas: *LexA* y *RecA* con la participación de la holoenzima de la ADN polimerasa III y los productos de los genes *Umu*. En *Drosophila* se han identificado once genes cuyos productos intervienen en este tipo de "reparación" que son análogos al grupo *rad6* de *S. cerevisiae* e incluyen a *mus101*, *mus206*, *mus310*, *mus205*, *DNApol-eta/ Rad30A*, *DNApol-iota/ &agr;/ UMUC*, *Hus1-like*, *rad9*, *UbcD6/ rad6*, *mus108* y *mus311*.

b. Unión de *SSBs* y *DSBs*

Muchos de los *SSBs* son producto de la síntesis sin corrección de errores o del efecto de los rayos X. La mayoría de los rompimientos son complejos y se producen por conversión química o enzimática de otros productos de la irradiación. Los cortes 3' OH y 5' P no son letales. Otros rompimientos se hacen en sustratos como timina-glicol, residuos de urea o sitios AP que son atacados por la endonucleasa III que genera un rompimiento simple en 3'. Estos daños son reparados en pocos segundos en forma semejante a como se unen los fragmentos de Okazaki. Una ruptura simple o doble (*SSBs* o *DSBs*) dispara al sistema enzimático de corrección de errores (*MMR*) y a la reparación por recombinación. Si no hay impedimento, la reparación es realizada por la ADN polimerasa I en procariotos, la ADN polimerasa beta o epsilon en eucariotos y las ADN ligasas.

c. Recombinación defectuosa; reparación post-replicadora recombinogénica de rompimientos en ambas hebras (*DSB*)

La reparación de rompimientos en ambas cadenas del ADN (*DSBs*) se inicia deteniendo la transcripción, el ciclo celular y por último reparando el daño. Este mecanismo se relaciona

con los diferentes tipos de radiación ionizante que provocan principalmente rompimientos dobles y con el daño provocado por ROS. La reparación imperfecta de las DSBs produce mutaciones o rearrreglos cromosómicos y la muerte celular si no son reparadas. Se ha observado que en levaduras la reparación predominante es por recombinación de homólogos (HRR) y en mamíferos es por recombinación de no-homólogos (NHEJ). Hace muchos años se detectó que las proteínas que intervienen en la reparación de las DSBs también intervienen en los rearrreglos típicos de los segmentos génicos de los loci de los receptores de las células T y B, durante el desarrollo del sistema inmune de vertebrados. Esa recombinación (*V(D)J recombination*) permite a las células una gran diversidad en la respuesta inmune (Singleton y Jeggo, 1999).

Una cinasa Ser/Tre dependiente del ADN (*DNA-PK*) interviene en el primer paso de la reparación, al pegarse a los extremos libres de los rompimientos dobles y promover la recombinación de homólogos (HRR). La *DNA-PK* tienen tres componentes: Ku70 (*mei41/rad52/tor1* y *mus309/Ku70* en *Drosophila*), Ku86 (*Ku80* en *Drosophila*) y *DNA-PKcs* (*cs* significa subunidad catalítica, *XRCC7*) que se asocian por inducción del daño. Este último componente pertenece a la familia fosfatidil-inositol cinasas (PI3). Cuando se autofosforila la *DNA-PKcs* se separan Ku70 y Ku86 del ADN y se produce la inactivación del complejo (Wu y Lieber, 1997). La actividad de la *DNA-PK* se ha estudiado en los once grupos complementarios de los genes humanos llamados XRCC (*X-ray repair cross-complementing*) cuyos mutantes pertenecen a cuatro grupos: *XRCC4*, *XRCC5/Ku80*, *XRCC6/Ku70* y *XRCC7/DNA-Pkcs*. La cinasa *DNA-PKcs* puede fosforilar a muchos sustratos *in vitro*, como Ku, p53, Rp-A y factores de transcripción por lo cual también interviene en la regulación del ciclo celular (Singleton y Jeggo, 1999).

En *Drosophila* el gen *okr* (*DhR54/DmRAD54*) produce una helicasa dependiente de ATP, que interviene en la reparación de DSBs por recombinación homóloga meiótica o mitótica (Friedberg *et al.*, 1995) e interviene en la reparación de puentes entre bandas. Está presente en todo el ciclo de vida de *Drosophila*, pero se incrementa en embriones tempranos y en tejido ovárico, sugiriendo un papel en la recombinación meiótica y/o en la replicación asociada a la fertilización. Su mutante aumenta el daño por MMS y rayos X porque no repara los DSBs (Lehmann *et al.*, 1996; Kooistra *et al.*, 1997 y 1999).

Otros genes en *Drosophila* que participan en la reparación de DSBs y diversas lesiones, por recombinación mitótica y/o meiótica son: *Rad1*, *Rad17*, *mei-41* (que también es sensible a la UV), *mus309/Ku70*, *Ku80*, *mus304*, *CG12407/rad50*, *Rad51*, *Rad51C*, *Rad51D*, *RecQ4*, *mre11*, *mus312*, *mus308* y *mus302* (que es sensible a la cafeína).

d. Reparación de desemparejamientos o corrección de errores (MMR: mismatch repair)

Las células de procariotos y eucariotos tienen la posibilidad de reparar el daño producido por los desemparejamientos entre los pares de bases o por rompimientos de la cadena. El origen de estos daños es múltiple, por ejemplo, por errores en la replicación, por translesión, por formación de heterodúplex entre dos moléculas homólogas del ADN recombinantes o por desaminación de 5-metilcitosina. La corrección de errores (MMR) se ha relacionado con los procesos de escisión BER y NER, sin embargo esta reparación involucra la escisión y resíntesis de cientos de nucleótidos. Se demostró que este proceso es muy similar en procariotos y eucariotos y que cuando es deficiente aumenta la tasa espontánea de mutación.

El proceso en *E. coli* implica que las cadenas progenitoras con la secuencia original sean reconocidas porque están metiladas en la adenina, de las secuencias GATC. Las cadenas

recién sintetizadas tienen un periodo en el que carecen de dicha metilación. Ésa es la señal que reconoce el sistema enzimático para corregir los errores en el ADN recién sintetizado, considerando la información original de la cadena parental. La reparación se realiza con el producto de varios genes: *mutH*, *MutL/PMS1*, *mutS/MSH2* y *uvrD (mutU)*. El producto de este último es la proteína *uvrU* o helicasa II. Se requiere además la presencia de ADN polimerasa III holoenzima, exonucleasas I y VII, exonucleasa *RecJ*, ADN ligasa con su co-sustrato NAD^* , ATPs y *SSB (single-stranded-DNA complexes)* (Fig. 1.9). Todas las observaciones realizadas en *E. coli* y en levaduras han permitido proponer el siguiente modelo para *MMR* (Friedberg *et al.*, 1995; Karran y Bignami, 1999):

- a) Un dímero de *MutS* con actividad ATPasa, se pega a los pares de bases incorrectos.
- b) En otra reacción dependiente de ATP, un dímero de *MutL* se pega a *MutS* y produce un pliegue de la cadena en donde está el error.
- c) La endonucleasa *MutH* corta el ADN en cualquiera de los lados del sitio GATC no metilado. La escisión de los nucleótidos depende del sitio en el que esté la secuencia GATC.
- d) Una ADN-helicasa II (*UvrD*) coordina la acción de exonucleasas que eliminan los nucleótidos incorrectos. La eliminación en el sentido $5' \rightarrow 3'$ lo hace la exonucleasa VII o *RecJ*. La eliminación en el sentido $3' \rightarrow 5'$ lo realiza la exonucleasa I. La degradación exonucleotídica es unidireccional y elimina el segmento incorrecto de la banda no metilada, que pueden ser 1000 o más bases.
- e) La síntesis de la cadena se inicia cerca del sitio GATC por la ADN polimerasa III (holoenzima) junto con proteínas *SSB* y una vez replicada es sellada por una ADN ligasa.
- f) Posteriormente la enzima *Dam* metilasa metila las secuencias GATC de la cadena recién sintetizada.

En humanos esta reparación se relaciona directamente con cáncer, como el colo-rectal. Sus componentes coinciden con los descritos para *E. coli*. Es bidireccional y se inicia con uno de dos heterodímeros *hMutS*alfa y *hMutS*beta que se unen respectivamente a los dímeros *hMSH2:hMSH6* y *hMSH2:hMSH3*. Estas proteínas son homólogas de *MutS* y se pegan al par erróneo, sin necesidad de la secuencia GATC metilada. Las *hMSH* alfa se pega a errores de un par y la beta a errores de 2-4 bases. Un heterodímero *hMutL*alfa, compuesto por *hMLH1* y *hPMS2* interviene (*l*) facilitando la estabilidad del complejo ADN-proteínas. Una vez que se cortaron las bases incorrectas, participa una ADN polimerasa delta que usa a la proteína *PCNA* para unirse al ADN. En la síntesis parece ser necesaria la proteína *Rp-A* y se desconoce qué tipo de ligasa cierra la cadena (Karran y Bignami, 1999).

En *Drosophila* se ha demostrado la reparación por corrección de errores en la que interviene el producto del gen *spellchecker 1* que es homólogo de *mutS/hMSH2*. Se han detectado otros genes que codifican proteínas que participan en este mecanismo: *CG2183/hMLH1*, *CG7003/MSH6*, *Mlh1/mutL* y *Pms2/mutL*.

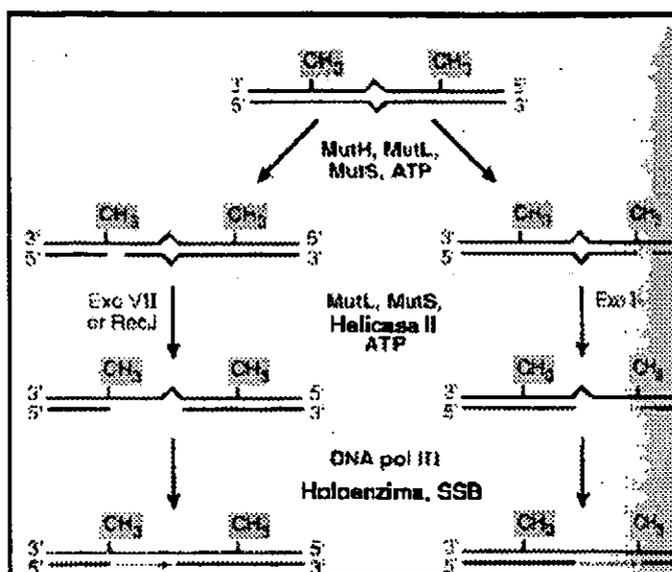


Fig. 1.9. La reparación de errores requiere la activación de enzimas (MutH, MutL, MutS), helicasas que abran la cadena, endonucleasas que corten (MutH), enzimas que eliminen el segmento dañado (Exonucleasa VII, RecJ o Exonucleasa I), polimerasas (III), SSB y ligasas (Modificado de Friedberg *et al.*, 1995).

e. Reparación meiótica

En *Drosophila* se han encontrado mecanismos de reparación meiótica relacionados con los genes *tos* y *mei217* los cuales se han detectado en las células germinales de hembras y en los primeros estadios embrionarios. Intervienen en escisión, corrección de errores, recombinación meiótica y reparación de *DSBs*.

f. Genes sin clasificar, sensibles a mutágenos

En *Drosophila* son once los genes sensibles a mutágenos que a la fecha no han sido clasificados con respecto al mecanismo de reparación del ADN en que participan: *mus102*, *mus105*, *mus109*, *mus111*, *mus112*, *mus202*, *mus203*, *mus207*, *mus208*, *mus211*, *mus301*, *mus305* y *mus307*. La mayoría son hipersensibles al MMS y a las radiaciones. En este grupo se ubicaba *mus309*, sin embargo ahora se conoce que participa en la producción de Ku70/IRBP la cual está involucrada en la recombinación mitótica y en la reparación de los *DSBs* (FlyBase.bio.indiana.edu:82/, 2001).

g. Otro genes de *Drosophila* involucrados en la reparación del ADN

En *Drosophila* se han detectado numerosos genes cuyos productos intervienen en la reparación del ADN. La mayoría de ellos son identificados sólo por su secuencia y posición cromosómica, pero no se conocen mutantes. En el caso de algunos de ellos, sólo se ha propuesto que intervienen en la reparación del ADN. Como en los casos anteriores existen homologías y similitudes con los genes de otros organismos. De esas similitudes se ha deducido que intervienen en uno o más de los mecanismos de reparación del ADN que han sido descritos (APÉNDICE, Tabla 1.1 y 1.2).

h. Reguladores del ciclo celular o puntos de verificación

En levaduras, los genes *cdc* que controlan el ciclo celular también están involucrados en el metabolismo y en la reparación del daño al ADN. Antes de multiplicarse, los genes *rad1*, *rad3*, *rad7*, *rad9*, *rad26* y *hus1* localizan el daño en el ADN y detienen la replicación.

En *Drosophila* los genes de la familia PI3-cinasas como *Pi3K59F* y *mei-41*, su papel como cinasas reguladoras que estabilizan el ciclo celular se enfatiza permitiendo la reparación del daño en eucariotes.

El gen *mei41* se hiperfosforila si hay daño en el ADN, para retrasar la fase S del ciclo celular. El mutante *mei41* es esencial en el paso a blástula media. Le confiere sensibilidad a los mutágenos por un defecto en la post-replicación que es sensible a la cafeína, además produce frecuencia alta de rompimientos cromosómicos e inestabilidad. El alelo *mei-41D12* despliega hipermutabilidad a los agentes alquilantes, defecto en la reparación por escisión y disminución en la recombinación meiótica.

La acción de estos genes puede subvertirse por cambios en el estado de fosforilación de las proteínas de puntos de verificación. En las proteínas RpA de células irradiadas con UV estas proteínas se hiperfosforilan, permitiendo que se detenga la síntesis del ADN para su reparación en la fase S. En células normales humanas la cinasa II dependiente de calcio/calmodulina, indica a la célula un retraso en la fase S. Esta cinasa es defectuosa en el mutante *atm*, homólogo de *mei41*, que provoca el síndrome humano de *ataxia telangiectasia* incapaz de reparar los *DSBs* causados por radiaciones y/o radicales libres (Lehmann *et al.*, 1996). Los genes de *Drosophila* que intervienen en este mecanismo de regulación que desencadena diferentes mecanismos de reparación del ADN dependientes del ciclo celular son numerosos y se muestran en el APÉNDICE, Tablas 1.1 y 1.5.

1.5. Efecto de los metales sobre la reparación del ADN

En general, se considera que los metales son agentes epigenéticos, comutágenos o promotores del daño, debido a que por su actividad química producen diferentes efectos sobre los organelos, las células y los organismos.

El efecto genotóxico de algunos metales (Ni^{2+} , As^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{6+}) se ha valorado a través de diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro* con bacterias y células de mamíferos (Hartwig, 1995). Se ha mostrado en animales la acción carcinogénica y el aumento de la transformación neoplásica provocada en células de mamíferos por virus o agentes directos. En bacterias la mayoría de los metales no son mutagénicos. En células de mamífero en cultivo, los efectos directos son negativos o débiles y se ha propuesto que modulan la acción de otros agentes genotóxicos. En células de mamíferos el daño genotóxico potencial es por formación de *ROS* que dañan al ADN y por interferencia con los mecanismos de reparación o de síntesis del ADN (Hartwig, 1995). Hartwig *et al.* (1990) han propuesto una acción indirecta de Pb^{2+} , de Ni^{2+} , de Cd^{2+} , de Cr^{6+} y arsenito de sodio, en los mecanismos de reparación, como un importante mecanismo general de genotoxicidad de los metales. En la prueba del ala en *D. melanogaster* los cloruros metálicos CoCl_2 , MnCl_2 , MoCl_3 , NiCl_2 y ZnCl_2 mostraron ser genotóxicos, mientras que CrCl_3 , FeCl_2 y FeCl_3 no lo fueron (Ogawa *et al.*, 1994). Con la prueba genotóxica UZ del ojo, que usa el locus inestable *white*, resultado de la inserción de un elemento móvil en el locus *white*, Rasmuson (1985) encontró resultados negativos de la genotoxicidad del nitrato y del cloruro de plomo.

Para interpretar las diferencias en los resultados de los diversos ensayos, aún existen problemas. En los ensayos *in vitro*, se exponen directamente las células a concentraciones en

general muy altas de estos metales, que no se logran *in vivo*. Mientras que con los ensayos *in vivo* los niveles muy altos producen toxicidad y en ocasiones pocos sobrevivientes. En estos resultados interviene la habilidad de los compuestos metálicos para competir con los iones metálicos esenciales y formar complejos con las biomoléculas, además de desequilibrios en las señales mediadas por el Ca^{2+} (Hartwig, 1995).

1.5.1. Participación de los cationes metálicos divalentes en la reparación del ADN

Los compuestos de níquel, cadmio, cobalto y arsénico son carcinógenos bien conocidos. Su modo de acción no es fácil de comprender, ya que su acción es débil o restringida a concentraciones comparativamente altas a las que con el cromo VI se obtienen. Hay evidencias de que los sistemas de reparación del ADN son blancos muy sensibles a los cationes Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} y As^{2+} , disminuyendo la eliminación de las lesiones en el ADN y aumentando el riesgo de formación de tumores. Sin embargo los mecanismos son completamente diferentes dependiendo por ejemplo de la habilidad del metal para competir con los iones Mg^{2+} o desplazar los iones Zn^{2+} de los motivos "*Zn-finger*" en las enzimas de reparación del ADN (Hartwig, 1998).

La influencia del arsenito de sodio (NaAsO_2) y el sulfato de cadmio (CdSO_4) sobre la persistencia de lesiones en el ADN se estudió con el ensayo cometa en células humanas de la sangre y fibroblastos-SV40 transformados (MRC5CVI). Los mutágenos utilizados fueron el MMS y el benzo(a)pireno junto con un post-tratamiento con cada uno de los compuestos de Cd^{2+} y As^{2+} . Ambos metales inhibieron la reparación por lo que se sugiere una fuerte interacción (Hartmann y Speit, 1996). En el plásmido CoI E1 se estudió con electroforesis, la estimulación e inhibición de la inducción de rompimientos de la cadena y enlaces entre las cadenas del ADN por 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) con poliaminas y cationes inorgánicos. El rompimiento inducido por BCNU fue disminuido por Na^+ , Mg^{2+} y $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$. En contraste estos cationes aumentaron los enlaces provocados por el BCNU con una estimulación en orden descendente del $\text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$ (Srivenugopal y Ali-Osman, 1990).

Ciertos iones metálicos específicos (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+}) influyen sobre las secuencias de ADN d(GA x TC) ya que pueden formar conformaciones diferentes de la hélice B. A bajas concentraciones de los iones metálicos estos forman [(GA(GA X TC))] pero a mayores concentraciones se detectan "*hairpins* (GA x GA)" intramoleculares. La presencia del Zn^{2+} reduce significativamente la reactividad de los "*hairpins* (GA x GA)" lo que sugiere una interacción directa del ión con el N7 de las guaninas. Este efecto es específico para cadenas antiparalelas d(GA)_n homo-duplex lo cual indica que el Zn^{2+} juega un papel importante en la estabilización de estos "*hairpins* (GA x GA)" intramoleculares (Ortiz-Lombardía *et al.*, 1998).

La inducción de alteraciones funcionales y estructurales del material genético por los cationes divalentes se apoya en la acción del quelante EDTA. Éste afecta la inhibición de la síntesis de ADN en cultivos primarios de células de mamíferos, favorece cambios morfológicos de la cromatina y de cromosomas en células de plantas y animales. En numerosos sistemas de prueba se ha reportado un leve rompimiento de cromosomas y la inducción de mutaciones. Incrementa la frecuencia de aberraciones inducidas por mutágenos y de la recombinación meiótica. Inhibe en *E. coli*, *Micrococcus radiodurans* y células de criceto chino la reparación después del tratamiento con bleomicina o con radiaciones ionizantes. En células de plantas mostró inhibir la síntesis de ADN no programada (UDS). El

secuestro de los iones metálicos por este quelante es obviamente el responsable de estas alteraciones (Heindorff *et al.*, 1983).

1.5.2. Mecanismos de reparación que son influidos por los cationes metálicos divalentes

Reparación Pre-replicadora

Prevención de errores

En el complejo multiproteico derivado de células humanas y denominado "synthesome" que realiza la replicación del ADN, se demostró que el Hg^{2+} inhibe específicamente la actividad de la ADN polimerasa y la fidelidad (Sekowski *et al.*, 1997).

Mecanismos directos de reparación (reversión)

Eliminación de los grupos alquilo pequeños

En *E. coli* tratada con N-metil-N-nitroso-urea (MNU), MMS y metil yoduro se suprimió la presencia de la O^6 -MGTasa en presencia del Cd^{2+} y el Hg^{2+} potenciándose el daño producido por MNU y MMS. Se sugiere que los efectos comutagénicos de estos metales se deben a la inhibición de la expresión de los genes *ada* y *alkA* (Takahashi *et al.*, 1991). En la cepa de *E. coli* CHS26/pYM3 tratada con MNU, el Cd^{2+} y el Hg^{2+} inhibieron la inducción de beta-galactosidasa. Los resultados indican un mecanismo que involucra una interacción específica del Cd^{2+} o el Hg^{2+} con la O^6 -MGTasa (Takahashi *et al.*, 1988). Por el contrario, el producto Ada en *E. coli*, enzima que acepta los metil fosfotriésteres en uno de sus residuos Cys, se autocataliza por una fuerte unión del residuo Cys-69 con un ión de Zn^{2+} . Esta proteína tiene la habilidad de unirse a secuencias de ADN específicas e inducir a genes que confieren la resistencia a agentes metilantes. El motivo de Zn^{2+} de esta proteína muestra parte del mecanismo de la reparación del ADN activada por metales (Myers *et al.*, 1993).

La endonucleasa V T4, es una glucosilasa específica para la reparación de los dímeros de pirimidina la cual contiene un residuo Cys que se une a varios metales (Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+}). Estos metales impiden el cambio estructural de la proteína después de su unión con el dímero de pirimidina o interfieren estéricamente con el sitio activo de la enzima, que contiene el residuo de cisteína, impidiendo el acceso al dímero y consecuentemente la incisión en el sitio dañado (Prince *et al.*, 1991).

BER: reparación por escisión de bases

En células humanas la endonucleasa HAP1 para sitios AP presenta una región crítica. Ésta contiene un par de residuos Asp/His que en unión con un residuo glutamato coordinado con un ión metálico cataliza sus múltiples funciones (Barzilay *et al.*, 1995).

La exonucleasa III de *E. coli* revela dos plegamientos simétricos alfa-beta de cuatro capas, similares a los de la desoxirribonucleasa I y ribonucleasa H. El dCMP y Mn^{2+} se unen a un extremo del sandwich alfa-beta, en una región dominada por un potencial electrostático positivo.

Se ha demostrado que un bucle de la endonucleasa IV intercala sus cadenas laterales con el sitio AP para realizar su función. Se sugiere que este bucle tiene 3 iones Zn^{2+} que participan directamente en el corte de la unión azúcar-fosfato (Hosfield *et al.*, 1999).

En las endonucleasas AP los residuos conservados evolutivamente, desde las bacterias hasta el hombre, incluyen este sitio activo que participa en el rompimiento del enlace fosfato en los sitios AP a través del ataque nucleofílico facilitado por la unión de un ión metálico (Mol *et al.*, 1995).

La proteína *FaPy*-ADN-glucosilasa (Fpg) de *E. coli* realiza actividades de glucosilasa, corte de sitios AP y escisión de desoxyribosa. Se sugiere que esta proteína tiene un motivo "Zn-finger" con cuatro residuos de Cys y que es capaz de sustituir el Zn^{2+} por Cu^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} . La alteración de este motivo por sustitución con estos metales, se asocia con la disminución en la capacidad de unión al ADN y de sus actividades enzimáticas (O'Connor *et al.*, 1993). El Cd^{2+} y el Cu^{2+} inhiben a la proteína XPA de mamíferos de la misma manera que lo hacen con la proteína bacteriana Fpg. El Co^{2+} y el Ni^{2+} afectaron a la proteína XPA pero ninguna de estas proteínas fue inhibida por el As^{2+} , ni por el Pb^{2+} . Se ha propuesto que cada proteína con "Zn-finger" tiene sus propias características estructurales y diferente sensibilidad a determinados metales (Asmuss *et al.*, 2000).

En *E. coli* la reparación del ADN por la enzima MutY (adenin-glucosilasa-AP liasa) implica que reconozca y repare la 7, 8-dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanosina así como los desemparejamientos 2'-desoxiguanosina (OG:A). Ésta tiene una secuencia homóloga al grupo $[4Fe-4S]^{2+}$ de la endonucleasa III. El ensamblaje de esta secuencia y el plegamiento de MutY fueron estudiados y se encontró que se requiere la presencia de este grupo, porque es crítico para el reconocimiento del ADN y necesario para su actividad (Porello *et al.*, 1998).

NER: reparación por escisión de nucleótidos

En embriones de *D. melanogaster* las proteínas DDB P1, P2 y P3 se unen específicamente al ADN dañado con UV. La DDB P1 lo hace preferentemente a (6-4)fotoproductos mientras que la DDB P2 lo hace a dímeros de pirimidina. Ambas proteínas requieren iones Mg^{2+} para unirse al ADN (Kai *et al.*, 1995). La unión de la "DNA polymerase beta" de mamíferos al ADN para reparar rompimientos depende de dos dominios de 31Kd y 8-Kd. Ambos dominios contienen un motivo "helix-hairpin-helix" (HhH) que se une al ADN auxiliado por un ión metálico. Existe una similitud entre la secuencia del motivo HhH de la endonucleasa III de *E. coli* y la del dominio 8kDa de la "DNA pol beta" lo cual sugiere que ambas se unen de un modo similar al ADN (Pelletier *et al.*, 1996).

En animales experimentales la carcinogenicidad del cobalto se ha demostrado, mientras que la mutagenicidad en células de mamífero *in vitro* es más bien endeble. Se ha mostrado que el Co^{2+} inhibe la reparación del daño causado por la luz UV-C.

En fibroblastos humanos se demostró con la técnica "alkalyne unwinding" que el Co^{2+} inhibió la incisión y la polimerización en NER, pero no la unión por las ligasas. Con la T4 endonucleasa V se demostró que la incisión en los dímeros de pirimidina ciclobutanos es afectada por concentraciones de 150 microM. Se ha propuesto que la competencia del Co^{2+} con el Mg^{2+} podría ser la responsable de estos resultados (Kasten *et al.*, 1997).

Los efectos carcinógenos de los compuestos de Ni^{2+} pueden reflejar variaciones en su capacidad de proveer iones Ni^{2+} en sitios críticos adentro de la célula. Este metal inhibe la reparación por escisión y su capacidad carcinogénica puede ser suprimida o modificada por otros metales como el Mg^{2+} y el Mn^{2+} (Sunderman, 1989).

El $NiCl_2$ mostró en células de criceto chino V79 inducción de mutaciones en el locus HGPRT así como intercambio de cromátidas hermanas (SCEs). Con la luz UV se mostró un pronunciado efecto comutagénico. Ya que no se demostró un efecto comutagénico con el metil metanosulfonato (MMS) se sugiere que la inhibición de la reparación del ADN por el Ni^{2+} se realice en BER "long patch" que elimina a más de una base y en NER. Esta inhibición podría ocurrir por el reemplazo de otros cationes divalentes esenciales y en la regulación del proceso (Hartwig y Beyersmann, 1989). El Ni^{2+} aumenta la respuesta citotóxica y genotóxica

a la UV, los rayos-X y los agentes citotóxicos cis-platinum, trans-platinum y mitomicina C. Los estudios en combinación con UV indican que hay una inhibición de la reparación posiblemente en la incisión, que podría deberse a cambios estructurales en el ADN o a interacciones con las proteínas de reparación por competencia con iones metálicos esenciales (Hartwig *et al.*, 1994).

Para estudiar el efecto co-clastogénico del Cd^{2+} células de criceto chino CHO K1 y células humanas XP20SSV deficientes en la reparación por escisión, éstas fueron tratadas con mitomicina C (MMC) y 4-nitroquinoleína 1-óxido (4NQO). El Cd^{2+} incrementó las aberraciones cromosómicas producidas por la MMC en la células CHO K1 tratadas en la fase G1 y en las XP20SSV. Los resultados obtenidos sugieren que inhibe la reparación pre-replicadora, posiblemente la escisión (Yamada *et al.*, 1993).

Reparación Post-Replicadora

Reparación post-replicadora recombinogénica de rompimientos dobles (DSBs)

Las proteínas RuvA y RuvB interaccionan específicamente con los empalmes de Holliday para facilitar el intercambio de extremos durante la recombinación y la reparación del ADN. RuvA actúa como un factor accesorio que se pega a las uniones y permite que RuvB funcione como una helicasa. Se demostró que el complejo RuvAB-Holliday requiere la presencia de cationes metálicos divalentes y que ambas proteínas participan en el paso inicial que lleva a la migración dependiente de ATP, de los extremos libres del ADN (Hiom y West, 1995).

Reguladores del ciclo celular o puntos de verificación

El Cd^{2+} a dosis no citotóxicas interfiere con la reparación y aumenta la genotoxicidad de agentes mutagénicos directos. Con 1 microM estimula la síntesis de ADN y la proliferación de varias líneas, mientras que a concentraciones más elevadas inhibe estos procesos.

Estimula la expresión de *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *p53*, todos factores de transcripción y de los genes que codifican para las metalotioneínas, glutatión y proteínas de estrés (*heat shock proteins*). La modulación que ejerce el Cd^{2+} sobre la actividad génica se ha discutido en términos de interferencia con las señales celulares a nivel de receptores de membrana, homeostasis del Ca^{2+} y del Zn^{2+} , fosforilación de proteínas y modificación de factores de transcripción. La evidencia indica que sus propiedades carcinogénicas se deben a interferencia con la reparación y a la interferencia con los mecanismos que controlan la mitosis (Beyersmann y Hechtenberg, 1997).

En cuanto a proteínas supresoras de tumores se ha demostrado que *p53* es un factor de transcripción que requiere unirse a iones de Zn^{2+} para estar activo. El uso de quelantes y la exposición al Cd^{2+} impiden su papel como factor de transcripción en respuesta al daño. Se cree que la regulación por metales juega un papel muy importante en el control de *p53* y que la perturbación de éste podría explicar el papel potencialmente carcinógeno de numerosos compuestos metálicos (Meplan *et al.*, 1999).

1.5.3. Efectos del plomo en la reparación del ADN

En las secciones precedentes se ha mencionado la controversia que existe sobre la acción genotóxica del plomo. Como otros metales divalentes, el plomo ha mostrado su participación en la producción de ROS, alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} y de los sulfhidrilos (Stohs y Bagchi, 1995). Los efectos de este metal sobre los mecanismos de reparación del daño al ADN se ha dirigido especialmente hacia la reparación por escisión de nucleótidos (NER) o de bases (BER).

In vitro el peróxido de hidrógeno con el Pb^{2+} introducen rompimientos en el ADN superenrollado de plásmidos, sugiriendo que este metal puede participar en la reacción de Fenton y dañar el ADN. Además a concentraciones no mutagénicas, el acetato de Pb modula la mutagenicidad del MNNG y la UV. Los datos soportan la hipótesis de que concentraciones no tóxicas de Pb^{2+} pueden inhibir la reparación del ADN. Así que a dosis biológicamente relevantes, el Pb^{2+} podría actuar como un comutágeno y posiblemente como cocarcinógeno, pero no como un iniciador carcinógeno genotóxico (Roy y Rossman, 1992).

El nitrato de plomo se une e inactiva a las ADN polimerasas (Popenoe y Schmaeler, 1979), a la O^6 -AGT y a la desoxyuridina trifosfato nucleotidohidrolasa (dUTPasa) de eucariotes que tienen en común al menos un grupo tiol indispensable para su actividad (Johnson, 1998). Este metal inhibe la reparación de los rompimientos simples del ADN (Foulkes, 1990) y se considera que dicha acción se deba a su unión con grupos tiol de las enzimas de reparación. Por otro lado se ha relacionado con la inhibición de la calmodulina y del glutatión. El glutatión (GSH) tripéptido γ -glutamilcisteinilglicina tiene un grupo tiol (-SH) que se asocia con una actividad radioprotectora y/o xenobiótica, por su capacidad de atrapar radicales libres de oxígeno, pero ésta se reduce cuando los metales se unen al glutatión o lo oxidan, inactivándolo.

Sicchitano y Pegg (1987) no encontraron interferencia del Pb^{2+} con la O^6 -AGT, mientras que los Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} y Ag^{2+} sí lo hicieron por interacción con el residuo cisteína de la transferasa. Bhattacharyya *et al.* (1988) obtuvieron inhibición completa de esta transferasa con Pb^{2+} . En extractos libres de células humanas con combinaciones de concentraciones óptimas de Mn^{2+} y de Pb^{2+} , se demostró un efecto inhibitorio de la actividad de escisión de nucleótidos en *NER* y el reconocimiento de la lesión (Calsoul *et al.*, 1996). Hartwig *et al.* (1990) y Hartwig (1995) propusieron que el plomo inhibe el paso polimerización/unión de hebras de la reparación por escisión y además interactúa con los procesos regulados por el calcio.

Skreb y Habazin-Novak (1977) demostraron en células humanas en cultivo, que el plomo inhibe parcialmente la reparación provocada por la irradiación con rayos X mientras que Foulkes (1990) no encontró efecto. En plántulas de arroz el Pb^{2+} fue sinérgico con rayos gamma mientras que el Ca^{2+} produjo mayor eficiencia en la reparación de las lesiones inducidas por los gamma (Reddy y Vaidyanath, 1978).

El acetato de plomo activó parcialmente *in vitro*, a la cinasa C (PKC) purificada de cerebro de rata, que es regulada por el Ca^{2+} y diacilglicerol (Markovac y Goldstein, 1988). Se demostró que también el Ca^{2+} activa la cinasa C (PKC) (Long *et al.*, 1994). Lo anterior sugiere que ambos metales pueden actuar como promotores o cocarcinógeno, al inducir la fosforilación de proteínas, como los receptores de factores de crecimiento y activar oncogenes. Las interacciones entre el calcio y el plomo han sido motivo de numerosas investigaciones.

1.5.4. Interacciones entre el calcio y el plomo

El Ca^{2+} es un catión indispensable en el metabolismo celular que compite con el plomo a nivel de membrana y en diversas funciones celulares como las de segundo mensajero (Goyer, 1990). Las interacciones del calcio y del plomo dependen de la concentración de iones libres (Ca^{2+} , Pb^{2+}) en la membrana plasmática y en el citosol. Los resultados de estas interacciones revelan inconsistencias que podrían ser resultado de la exposición a diferentes tiempos y concentraciones del plomo y de sus compuestos (Pounds, 1984). El metabolismo del calcio ha mostrado tener una asociación estrecha con el plomo (Ferrante, 1979; OPS., 1979; Pounds, 1984; Corey y Galvao, 1989; Goyer, 1990; Fuentes-Aguilar y Soto-Mora, 1993; Simons, 1993; Fullmer, 1997; y Johnson, 1998). En algunas poblaciones se han encontrado modificaciones en el metabolismo del calcio que limitan la acumulación del Pb^{2+} y aumentan la del Ca^{2+} . Los niveles de calcio en la dieta, el peso, la edad, el sexo y la talla influyen en la acumulación del plomo. También la solubilidad de sus compuestos y las condiciones ambientales. La accesibilidad al ADN es mayor en los tratamientos *in vitro* que *in vivo*, por lo que existen inconsistencias aún no resueltas.

Las dosis tóxicas de Pb^{2+} tienen un efecto directo sobre el transporte del Ca^{2+} - Pb^{2+} en las membranas celulares debido a que compiten con los canales y la bomba de Ca^{2+} (Simons, 1993). El plomo causa efectos indirectos sobre la homeostasis del calcio por interacciones numerosas con las mitocondrias, el núcleo, el retículo endoplásmico y con las proteínas reguladas por el Ca^{2+} como la calmodulina (Pounds, 1984; Simons, 1993). Aún quedan por resolver numerosas preguntas y siguen siendo válidas tres generalizaciones relacionadas con las interacciones entre ambos metales (Pounds, 1984):

1. La intoxicación con plomo, *in vivo* y en muchos sistemas *in vitro*, producen un aumento de los niveles de calcio tisulares o celulares.
2. La intoxicación aguda con plomo obtenida a través de experimentos farmacológicos, particularmente en sistemas que dependen de la movilización del calcio extracelular, produce frecuentemente antagonismos entre calcio y plomo.
3. La intoxicación crónica con plomo, en sistemas que dependen de la movilización del calcio intracelular, produce aumento de las funciones mediadas por el calcio.

1.5.5. El Ca^{2+} como señal de transducción o segundo mensajero

El Ca^{2+} es un importante regulador celular que al ser activado a través de señales extracelulares le permite actuar como segundo mensajero. El líquido extracelular contiene una concentración más de 10 000 veces la del citosol. Como la cantidad de Ca^{2+} intracelular es baja [10^{-7} M], la presión de difusión hacia el interior de la célula, a través de la membrana plasmática es enorme. Para mantener los niveles internos la célula tiene Ca^{2+} -ATPasas en la membrana plasmática y en la de retículo endoplásmico. También hay proteínas dependientes del Ca^{2+} y fosfatos con los cuales forma pirofosfatos que se depositan en como gránulos y que son inertes osmóticamente. En algunas células hay un sistema de antiporte Na^{+} - Ca^{2+} . Las mitocondrias lo almacenan a través del gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial interna, que se genera por la fosforilación oxidante, mediante un mecanismo de uniporte.

Cuando la célula se activa por la entrada de Ca^{2+} , la mayor concentración intracelular que se alcanza es 10^{-5} M. El Ca^{2+} regula unas 70 diferentes proteínas que tienen afinidad de unión cercana a 10^{-6} M y una selectividad 1000 veces mayor con respecto al Mg^{2+} (Alberts *et al.*, 1998). La calmodulina, proteína regulada por el Ca^{2+} , se une a numerosas enzimas

como las nucleótido cíclico fosfodiesterasas y las adenilato ciclasas, las Ca^{2+} -ATPasas de membrana, la bomba de K^+ -dependiente del Ca^{2+} , la fosforilasa cinasa y la cinasa de la cadena ligera de la miosina. Influye en la unión de iones en las membranas de corteza cerebral de rata y en la fosforilación de las membranas de cerebro de rata, entre otras funciones (Pounds, 1984; Simons, 1993; Alberts *et al.*, 1998).

El efecto del calcio sobre los mecanismos que regulan la actividad de ciertas proteínas se ha relacionado con la alquilación de células hepáticas de ratón por el acetaminofén. Este compuesto se caracteriza por producir una pérdida temprana de la regulación de iones, acumulación de Ca^{2+} en el núcleo y fragmentación del ADN *in vitro* e *in vivo*. Esta fragmentación es característica de la activación de una endonucleasa mediada por el Ca^{2+} , que deriva en citotoxicidad y necrosis. El ácido aurintricarboxílico inhibidor de una endonucleasa dependiente del Ca y el EGTA, agente quelante, disminuyeron significativamente la fragmentación del ADN y la citotoxicidad en los hepatocitos, lo cual demuestra la influencia del calcio (Shen *et al.*, 1992).

1.5.6. Niveles intracelulares del Ca^{2+} y la reparación del daño en el ADN

La perturbación del sistema de homeostasis celular del Ca^{2+} activa a varias enzimas líticas dependientes del Ca^{2+} , como fosfolipasas, proteasas y endonucleasas que contribuyen a la muerte celular (Orrenius *et al.*, 1992). Christansen *et al.* (1988) demostraron que la elevación del Ca^{2+} intracelular puede disparar la producción de radicales libres. En linfocitos humanos dañados con UV, la reparación del ADN tiene un nivel óptimo con la concentración de CaCl_2 1 mM en el medio. La UV produce aumento del Ca^{2+} citosólico, por mayor entrada del ión y por inhibición de la ATP- Ca^{2+} de la membrana plasmática. Se observó que si se eleva o reduce el Ca^{2+} celular de la concentración 1 mM, la reparación de cualquier daño se inhibe. De igual manera, si se inhibe la tirosina-cinasa, se eleva el Ca^{2+} citosólico y se bloquea la reparación (Gaftter *et al.*, 1997). El H_2O_2 produce daño en el ADN, reparación y aumento del Ca^{2+} citosólico, probablemente por entrada del ión y liberación de las reservas internas. Esta reparación depende de una tirosina-cinasa dependiente del Ca^{2+} y si se reduce la cinasa, se inhibe la reparación. Estos cambios en mostraron ser paralelos a los cambios en la concentración del Ca^{2+} (Korzets *et al.*, 1999). Todo lo anterior indica que los niveles intracelulares del Ca^{2+} tienen efecto sobre los mecanismos de reparación.

El efecto del calcio sobre los mecanismos que regulan la actividad de ciertas proteínas se ha relacionado con la alquilación de células hepáticas de ratón por el acetaminofén. Este compuesto se caracteriza por producir una pérdida temprana de la regulación de iones, la acumulación de Ca^{2+} en el núcleo y la fragmentación del ADN *in vitro* e *in vivo*. Esta fragmentación es característica de la activación de una endonucleasa mediada por el Ca^{2+} , que deriva en citotoxicidad y necrosis. El ácido aurintricarboxílico inhibidor de la Ca-endonucleasa y el EGTA, agente quelante disminuyeron significativamente la fragmentación del ADN y la citotoxicidad en los hepatocitos, lo cual demostró la influencia del calcio en los eventos descritos (Shen *et al.*, 1992).

Los datos indican que tanto el Ca^{2+} como el Pb^{2+} afectan la reparación del ADN por caminos diversos. Si se consideran las propuestas de Pounds (1984) sobre las interacciones entre el Pb^{2+} y el Ca^{2+} , puede plantearse que la competencia entre ellos debe influir sobre la reparación del daño en esa molécula.

1.6. *Drosophila melanogaster*

Es un organismo eucarioto, multicelular, díptero, que ha sido utilizado en estudios de genética y de la regulación del desarrollo. Los primeros estudios sobre genética de este insecto los realizó H. J. Müller en 1911. Fue en 1940 cuando Auerbach demostró la acción mutagénica del compuesto alquilante, mostaza nitrogenada con este organismo. Comúnmente conocido como mosca del vinagre, se propaga en medios de cultivo naturales o artificiales y en condiciones de control de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y con humedad relativa de 65% presenta un ciclo de 10 días (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. El cultivo de *Drosophila melanogaster* a 25°C y 65% de humedad permite tener adultos en sólo 10 días

FASE DEL DESARROLLO en <i>Drosophila melanogaster</i>	TIEMPO (días)
Huevo-embrión	1
Larva Primer estadio	1
Larva Segundo estadio	1
Larva Tercer. estadio	2 a 3
Pupa	3 a 4
Adulto	40

Dos hechos han permitido que este organismo sea ideal para el análisis genético: primero que no hay recombinación meiótica en los machos y segundo, que se pueden obtener balanceadores en los cromosomas que impiden la recombinación meiótica con el cromosoma homólogo (Saner, 1995). Se tienen actualmente al alcance líneas especialmente construidas, con marcadores genéticos específicos, para investigar *in vivo* el efecto de tratamientos diversos sobre los genes o sus productos: mutaciones, deleciones y recombinación mitótica. El efecto se puede cuantificar morfológicamente por aparición o pérdida del o los marcadores tanto en las células germinales como en las mitóticas. Hay tres ensayos bien validados que determinan el daño en las células: la prueba de letales recesivos ligados al sexo, en las germinales y la prueba en el ojo (Vogel, 1992) y en las alas en las células somáticas (Graf *et al.*, 1984) reuniendo así en los tres protocolos los elementos requeridos para los bioensayos en plazo corto.

Este eucarioto tiene 4 pares de cromosomas que en células somáticas en metafase (Fig. 1.2) se ven como: un par de cromosomas XX en las hembras que parecen varillas largas o una varilla larga (cromosoma 1) y un bastón en forma de gancho en su extremo, que es el cromosoma Y, en los machos; dos pares de metacéntricos largos con forma de V (pares 2 y 3) y un par de varillas cortas que es el par 4. La posición citogenética de los genes en los cromosomas de este insecto se registra de acuerdo con la estructura de los cromosomas en la siguiente forma: posición 0-20 en el cromosoma X, 21-40 en el brazo izquierdo del cromosoma 2 y 41-60 en su brazo derecho; 61-80 en el brazo izquierdo del cromosoma 3 y 81-100 en su brazo derecho, por último 101-102 en el cromosoma 4 (Ramos *et al.*, 1993).

1.6.1. La prueba en las alas (SMART)

Fue diseñada para detectar mutaciones asociadas frecuentemente con deleciones y recombinaciones somáticas (SMART) producidas en *Drosophila melanogaster* por la acción de agentes físicos o químicos (Graf *et al.*, 1984) y ha sido validada en más de 400 agentes químicos (Vogel, 1992; Graf, 1994; Guzmán-Rincón; Graf, 1995 y Vogel *et al.*,

1999). Para esta prueba se usan dos marcadores que afectan la apariencia de los tricomas de las alas: "multiple wing hairs" (*mwh*) que es una mutación recesiva homocigótica viable, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3), que en homocigosis produce tricomas múltiples por célula en lugar del tricoma único de la condición silvestre. El marcador "flare" (*flr*) es una mutación recesiva que afecta la forma de los tricomas, localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8). Se conocen tres alelos para este carácter y en condición homocigótica son letales. Sin embargo esta condición sí es viable en las células de los discos imagales del ala, y puede observarse en la cutícula del ala. Por su carácter letal, los alelos *flr* pueden conservarse en las líneas de *Drosophila melanogaster* introduciendo un balanceador con múltiples inversiones y un marcador dominante que es letal en estado homocigótico, y que están presentes en la línea *flr³/TM3, Bd^S: "flare, Third Múltiple 3, Beaded-Serrate"*.

Las larvas transheterocigóticas (*mwh +/ + flr*) pueden ser sometidas a tratamientos agudos o crónicos, a diferentes edades (48-92 h) y a distintos agentes genotóxicos, pero el daño producido en los discos imagales de la larva (Graf, 1995) es evidenciado en el fenotipo de los tricomas de la cutícula del ala del adulto que pueden ser *mwh* o *flare* en forma de manchas simples: pequeñas y grandes y manchas gemelas. Los eventos genéticos que producen las simples pueden ser mutación, recombinación, deleción, o pérdida del cromosoma y las gemelas solamente por recombinación somática (Fig. 1.9).

Las dimensiones de las manchas dependen del momento de la edad larvaria en que se provoca la mutación o la recombinación y se forma el clon. La relación entre el tiempo de inducción de clones de células mutantes en el disco imagal y la talla de la mancha resultante en el ala, son un aspecto básico e importante, relacionado con la prueba del ala. Los discos consisten en aproximadamente 50 a 100 células en el primer estadio larval y alcanzan una talla de aproximadamente 30,000 células en la pupa temprana cuando inicia la diferenciación del ala. De estas células son analizadas 24,400 en la prueba del ala. La proliferación continua durante el desarrollo de la larva permite aumentar la cantidad de células blanco presentes en el disco imagal. Por lo anterior, se espera un aumento en la inducción de clones conforme aumenta la edad de la larva. En contraste a la inducción de la frecuencia de clones, se espera que la talla de los clones disminuya conforme se incrementa la edad larvaria (Tabla 1.4). Esta relación inversa entre la talla del clon y su frecuencia como función de la edad de la larva fue demostrado previamente con la radiación ionizante y posteriormente con el metil-metanosulfonato (Graf, 1995). La prueba del ala, al igual que la de la mancha en el ojo, no son capaces de detectar a las células que retrasan su división por efecto del daño o a las que por efecto tóxico mueren durante el desarrollo (Saner, 1995).

Tabla 1.4. Relación entre la edad larvaria y la formación de clones *mwh* en los discos imagales de *D. melanogaster* alimentada con MMS 0.1 % (Tomado de Graf, 1995).

Edad (h)	24	36	48	60	72
Formación de clones en 10,000 células ($n \times m / N \times 24,400$) [*]	12.7	17.3	20.4	25.0	24.9

^{*}*n*= manchas con clon *mwh*, *m*= talla promedio de clon *mwh* y *N*= número de alas

1.6.2. Cruza estándar

En la cruce estándar para la prueba en las alas (SMART) se usan hembras de la línea *flr³/TM3, Bd^S* y machos de la línea *mwh* que producen dos tipos de genotipos: transheterocigóticos *mwh flr³⁺/mwh⁺ flr³* y heterocigóticos *mwh flr³⁺/mwh⁺ flr³⁺* TM3, *Bd^S*. Esta cruce detecta mutágenos directos y como presenta niveles regulados de la familia de genes *Cyp450* es capaz de activar los mutágenos indirectos, aunque en mucho menor intensidad, si se compara con la cruce de bioactivación elevada. En ella se obtienen dos fenotipos que son producto de la expresión del marcador *Bd^S* que está localizado en el cromosoma 3 (3-92.5): moscas de alas silvestres y moscas de alas serratia con una muesca en la punta (Tabla 1.5).

Tabla 1.5 Cruza estándar

Cruza P ₁	HEMBRAS		MACHOS
Genotipo	<i>mwh⁺ flr³/mwh⁺ flr³⁺</i> TM3, <i>Bd^S</i>	X	<i>mwh flr³⁺/mwh flr³⁺</i>
Fenotipo	Alas serratia con muesca en la punta y tricomas sencillos		Alas silvestres con tricomas múltiples
Gametos P ₁	<i>mwh⁺ flr³</i> y <i>mwh⁺ flr³⁺</i> TM3, <i>Bd^S</i>		<i>mwh flr³⁺</i>



Gametos P ₁	<i>mwh flr³⁺</i>	Fenotipo
<i>mwh⁺ flr³</i>	<i>mwh flr³⁺/mwh⁺ flr³</i>	Transheterocigóticos con alas silvestres
<i>mwh⁺ flr³⁺</i> TM3, <i>Bd^S</i>	<i>mwh flr³⁺/mwh⁺ flr³⁺</i> TM3, <i>Bd^S</i>	Heterocigóticos, alas serratia con muesca en la punta

Como resultado de los cambios en los cromosomas del par 3 (Fig 1.9) en las moscas transheterocigóticas con alas silvestres, se pueden producir mutaciones y recombinación que originan manchas simples y gemelas. En las moscas heterocigóticas con alas serratia sólo se pueden observar manchas simples que son resultado de mutaciones. Cuando se revisan ambos tipos de alas se puede calcular por diferencia entre las frecuencias de manchas, la contribución total que la recombinación (inciso b y d, Fig. 1.9) hace en las transheterocigóticas el agente genotóxico que se estudia.

1.6.3. Distribución de la frecuencia de manchas

Se requiere tener un estricto control de la temperatura para controlar la frecuencia de las manchas por ala (Graf, 1984). Las distribuciones de la frecuencia espontánea de manchas por individuo son asimétricas: la mayoría de las moscas no tienen manchas y algunas tienen manchas. La distribución en los testigos sigue en principio la distribución asimétrica de Poisson, con aproximación a la distribución normal (Frei y Würigler, 1995), pero en los tratamientos con efectos genotóxicos ésta presenta una sobredispersión con una distribución que tiene sus colas extendidas y la curva más aplanada. Esta heterogeneidad es debida a diferentes grados de sensibilidad a los agentes químicos en cada uno de los individuos.

1.6.4. Pruebas de ji cuadrada y de U en SMART

El software que analiza estadísticamente los resultados de SMART del ala detecta las diferencias que puedan existir entre los valores espontáneos en un testigo y las series de tratamientos a las que se someten las larvas. Para evaluar los efectos genotóxicos existen dos tipos de pruebas. Una basada en ji cuadrada para proporciones (de una cola), que compara proporciones de manchas por ala entre dos muestras. El efecto genotóxico es diagnosticado porque la frecuencia de manchas verdadera de los tratamientos es al menos, el doble de la frecuencia obtenida en los testigos negativos. Esta frecuencia es $m=2$ para manchas simples y totales y $m=5$ para manchas grandes y gemelas. Con esta prueba se tiene la probabilidad de definir un riesgo genotóxico mínimo inaceptable. Si se puede excluir este riesgo con una significancia estadística, entonces los resultados son negativos. Si la muestra no es lo suficientemente grande, los datos pueden ser insuficientes y el resultado es no concluyente. O sea que en los casos no concluyentes no se puede excluir la hipótesis nula, pero tampoco la hipótesis alterna. Los resultados con esta prueba tienen cuatro categorías: positivos, negativos, débiles y no concluyentes.

Se recomienda revisar al menos 110 alas para evitar los resultados no concluyentes en al menos 95% de los casos (Frei y Würigler, 1995). De esta manera cuando el tratamiento es verdaderamente no genotóxico o si lo es, en 95% de los casos uno puede decir que el resultado es negativo o positivo respectivamente. En la práctica este parámetro es importante para evaluar resultados negativos o de muy bajos efectos. A niveles bajos, los datos generalmente no presentan sobredispersión y tienen una distribución de Poisson (Frei, comunicación personal).

En este trabajo se hizo el análisis estadístico de los resultados de SMART en las alas, basado en la prueba no paramétrica de U (Mann-Whitney-Wilcoxon) de dos colas, no se puede definir el riesgo genotóxico mínimo inaceptable basados en la frecuencia de las manchas en los testigos negativos. Por lo tanto sólo se comparan los datos contra la hipótesis nula. Los resultados son no significativos o significativos. La ausencia de significancia nos dice que uno no puede concluir que el tratamiento produjo daño genotóxico, sin embargo no se puede eliminar completamente esta posibilidad, por lo tanto es lo mismo que un resultado no concluyente. Los resultados significativos nos permiten concluir con certeza que los resultados son positivos. SMART con la prueba de U analiza los datos sin la exigencia de una distribución normal y considera la variabilidad individual. En los individuos tratados con fuertes mutágenos hay más variabilidad de la teóricamente esperada y esas diferencias son encontradas al aplicar esta prueba. Esta prueba contiene con la sobredispersión que resulta de la presencia de algunos individuos con muchas manchas y otros pocos con muy pocas manchas (Frei, comunicación personal). Se recomienda analizar al menos 55 individuos por tratamiento número que depende de la verdadera frecuencia de manchas en las moscas no tratadas y que excluye el riesgo mínimo no aceptable (Frei y Würigler, 1995).

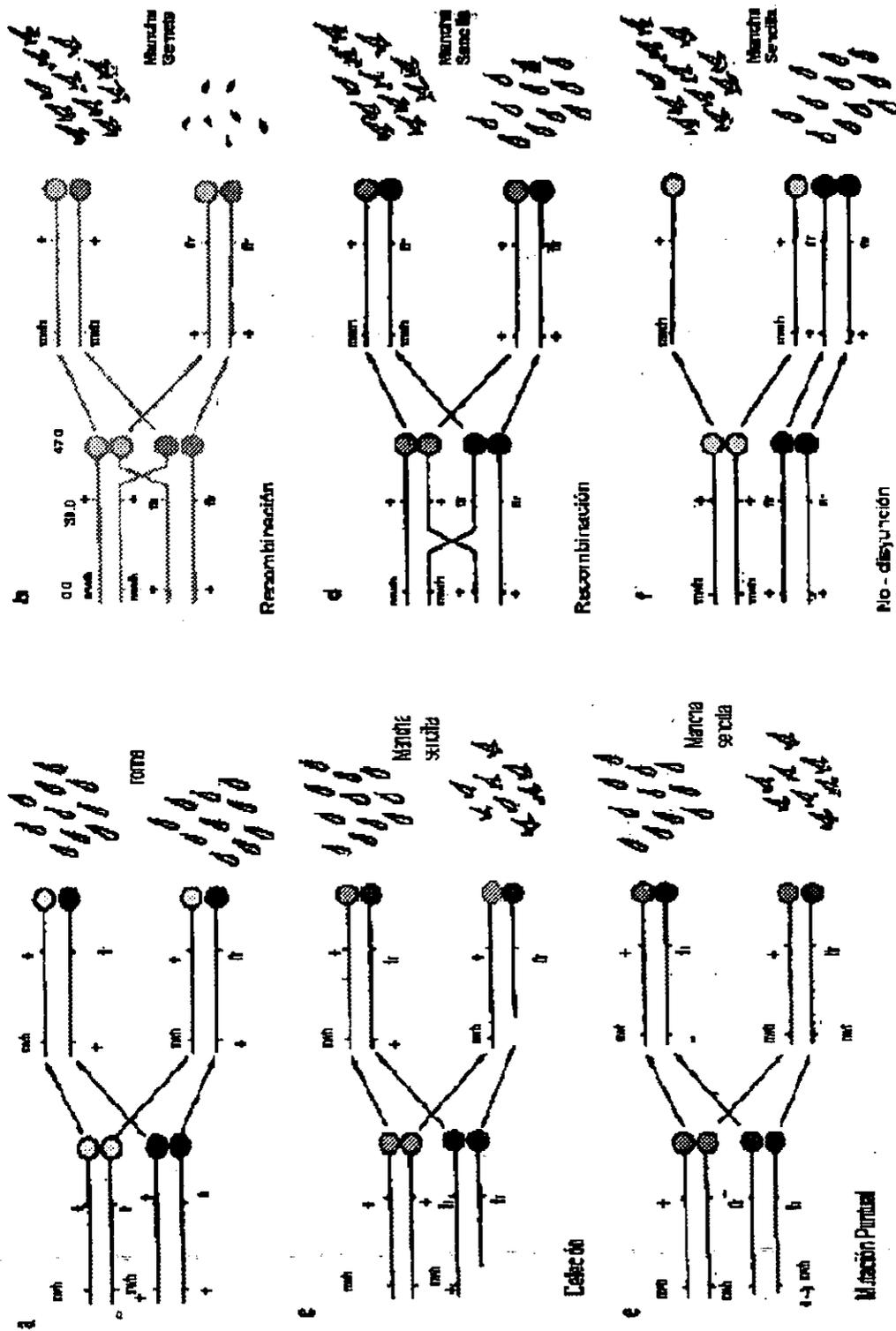


Fig.1.9. Cambios en los cromosomas que originan las manchas simples y gemelas en el ala de *Drosophila melanogaster*.

1.7. OBJETIVOS

Para la realización de este trabajo se consideraron los antecedentes controvertidos sobre la genotoxicidad del plomo en los experimentos *in vivo* e *in vitro*, la interacción entre el Ca^{2+} y el Pb^{2+} y la persistencia de diversas fuentes de contaminación de plomo en el ambiente.

Se evaluó la genotoxicidad de los nitratos de plomo y de calcio a través de experimentos independientes con larvas transheterocigóticas *mwh + / + flr³* de *Drosophila melanogaster* de la craza estándar (Graf *et al.*, 1984) del segundo y tercer estadio larvario.

Se evaluaron los efectos del Pb^{2+} y del Ca^{2+} sobre la respuesta genotóxica a un tratamiento agudo con el MMS (Graf, 1995). Para lograrlo se diseñaron experimentos independientes que permitieran evaluar el efecto de la presencia previa (pretratamiento) o posterior (post-tratamiento) de los nitratos, sobre la respuesta a un tratamiento agudo con este agente alquilante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Agentes químicos

El metil metano sulfonato (MMS) 12 mM (Fluka Buchs, Switzerland) se disolvió en agua bidestilada. A 2 ml de esta solución se le añadieron 300 mg de celulosa (microcristalina, Merck, Darmstadt, Alemania) en polvo para aplicar el tratamiento agudo con el agente alquilante a las larvas de 72 h de edad durante 2 h. Las soluciones de MMS (1.2 mM) y de uretano (0, 5, 10 y 20 mM) (Fluka Buchs, Switzerland) para los testigos positivos, se realizaron con agua bidestilada inmediatamente antes de añadirlas al medio de cultivo instantáneo (Fórmula 4-24; Carolina Biological Supply Co. Burlington NC).

Se prepararon soluciones frescas de nitrato de plomo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Merck, Darmstadt, Alemania) con agua bidestilada a 0.1, 0.5 y 1 mM. El medio de cultivo instantáneo (Fórmula 4-24; Carolina Biological Supply Co. Burlington NC) se utilizó para alimentar las larvas a partir de las 74 h de edad.

2.2. Líneas de *Drosophila melanogaster*: *mwh* y *flr³/TM3, Bd^S*

Se cruzaron hembras vírgenes *flr³ / TM3, Bd^S* con machos *mwh / mwh* para colectar huevos durante 8 h en medio preparado con una base sólida de agar (4% w / v) y levadura fresca. Se obtuvieron larvas de esta craza y se alimentaron según el diseño factorial descrito abajo.

2.3. Diseño experimental

En las Tablas 2.1 y 2.2 se presentan los factores y niveles que se consideraron para estos experimentos. En la Tabla 2.3 se muestran los diferentes tratamientos que se realizaron con las larvas transheterocigóticas. En los experimentos con sales metálicas y tratamiento agudo con MMS se hizo una repetición para cada serie y triplicados en cada tratamiento. Los pretratamientos se dieron de las 48 a 72 h de edad. El tratamiento agudo con MMS se dio de las 72 a las 74 h de edad. Los post-tratamientos con las sales metálicas se hicieron en larvas de 74 a 120 h de edad. En los testigos positivos MMS y uretano, sólo se hizo un experimento triplicado para cada tratamiento (Tabla 2.4).

1.7. OBJETIVOS

Para la realización de este trabajo se consideraron los antecedentes controvertidos sobre la genotoxicidad del plomo en los experimentos *in vivo* e *in vitro*, la interacción entre el Ca^{2+} y el Pb^{2+} y la persistencia de diversas fuentes de contaminación de plomo en el ambiente.

Se evaluó la genotoxicidad de los nitratos de plomo y de calcio a través de experimentos independientes con larvas transheterocigóticas *mwh + / + flr³* de *Drosophila melanogaster* de la cruce estándar (Graf *et al.*, 1984) del segundo y tercer estadio larvario.

Se evaluaron los efectos del Pb^{2+} y del Ca^{2+} sobre la respuesta genotóxica a un tratamiento agudo con el MMS (Graf, 1995). Para lograrlo se diseñaron experimentos independientes que permitieran evaluar el efecto de la presencia previa (pretratamiento) o posterior (post-tratamiento) de los nitratos, sobre la respuesta a un tratamiento agudo con este agente alquilante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Agentes químicos

El metil metano sulfonato (MMS) 12 mM (Fluka Buchs, Switzerland) se disolvió en agua bidestilada. A 2 ml de esta solución se le añadieron 300 mg de celulosa (microcristalina, Merck, Darmstadt, Alemania) en polvo para aplicar el tratamiento agudo con el agente alquilante a las larvas de 72 h de edad durante 2 h. Las soluciones de MMS (1.2 mM) y de uretano (0, 5, 10 y 20 mM) (Fluka Buchs, Switzerland) para los testigos positivos, se realizaron con agua bidestilada inmediatamente antes de añadir las al medio de cultivo instantáneo (Fórmula 4-24; Carolina Biological Supply Co. Burlington NC).

Se prepararon soluciones frescas de nitrato de plomo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Merck, Darmstadt, Alemania) con agua bidestilada a 0.1, 0.5 y 1 mM. El medio de cultivo instantáneo (Fórmula 4-24; Carolina Biological Supply Co. Burlington NC) se utilizó para alimentar las larvas a partir de las 74 h de edad.

2.2. Líneas de *Drosophila melanogaster*: *mwh* y *flr³/TM3, Bd^S*

Se cruzaron hembras vírgenes *flr³ / TM3, Bd^S* con machos *mwh / mwh* para colectar huevos durante 8 h en medio preparado con una base sólida de agar (4% w / v) y levadura fresca. Se obtuvieron larvas de esta cruce y se alimentaron según el diseño factorial descrito abajo.

2.3. Diseño experimental

En las Tablas 2.1 y 2.2 se presentan los factores y niveles que se consideraron para estos experimentos. En la Tabla 2.3 se muestran los diferentes tratamientos que se realizaron con las larvas transheterocigóticas. En los experimentos con sales metálicas y tratamiento agudo con MMS se hizo una repetición para cada serie y triplicados en cada tratamiento. Los pretratamientos se dieron de las 48 a 72 h de edad. El tratamiento agudo con MMS se dio de las 72 a las 74 h de edad. Los post-tratamientos con las sales metálicas se hicieron en larvas de 74 a 120 h de edad. En los testigos positivos MMS y uretano, sólo se hizo un experimento triplicado para cada tratamiento (Tabla 2.4).

Tabla 2. 1. Relación de los cuatro factores y niveles de tratamiento considerados en las series del diseño factorial para los experimentos con nitrato de plomo y de calcio

(C) MMS	(A) TRATAMIENTO	(B) [Ca(NO ₃) ₂] ó [Pb(NO ₃) ₂]	(D) SEXO F=HEMBRAS M=MACHOS
(C0) SIN MMS	(A1) PRETRATAMIENTO	(B0) 0 mM c/mm	C0,A1,F,B0
		(B1) 0 mM testigo paralelo	C0,A1,F,B1
		(B2) 0.1 mM	C0,A1,F,B2
		(B3) 0.5 mM	C0,A1,F,B3
		(B4) 1.0 mM	C0,A1,F,B4
		(B0) 0 mM c/mm	C0,A1,M,B0
		(B1) 0 mM testigo paralelo	C0,A1,M,B1
		(B2) 0.1 mM	C0,A1,M,B2
(C0) SIN MMS	(A2) POST-TRATAMIENTO	(B3) 0.5 mM	C0,A1,M,B3
		(B4) 1.0 mM	C0,A1,M,B4
		(B0) 0 mM c/mm	C0,A2,F,B0
		(B1) 0 mM testigo paralelo	C0,A2,F,B1
		(B2) 0.1 mM	C0,A2,F,B2
		(B3) 0.5 mM	C0,A2,F,B3
		(B4) 1.0 mM	C0,A2,F,B4
		(B0) 0 mM c/mm	C0,A2,M,B0
(C1) CON MMS	(A1) PRETRATAMIENTO	(B1) 0 mM testigo paralelo	C0,A2,M,B1
		(B2) 0.1 mM	C0,A2,M,B2
		(B3) 0.5 mM	C0,A2,M,B3
		(B4) 1.0 mM	C0,A2,M,B4
		(B0) 0 mM c/mm	C1,A1,F,B0
		(B1) 0 mM testigo paralelo	C1,A1,F,B1
		(B2) 0.1 mM	C1,A1,F,B2
		(B3) 0.5 mM	C1,A1,F,B3
(C1) CON MMS	(A2) POST-TRATAMIENTO	(B4) 1.0 mM	C1,A1,F,B4
		(B0) 0 mM c/mm	C1,A1,M,B0
		(B1) 0 mM testigo paralelo	C1,A1,M,B1
		(B2) 0.1 mM	C1,A1,M,B2
		(B3) 0.5 mM	C1,A1,M,B3
		(B4) 1.0 mM	C1,A1,M,B4
		(B0) 0 mM c/mm	C1,A2,F,B0
		(B1) 0 mM testigo paralelo	C1,A2,F,B1
(C1) CON MMS	(A2) POST-TRATAMIENTO	(B2) 0.1 mM	C1,A2,F,B2
		(B3) 0.5 mM	C1,A2,F,B3
		(B4) 1.0 mM	C1,A2,F,B4
		(B0) 0 mM c/mm	C1,A2,M,B0
		(B1) 0 mM testigo paralelo	C1,A2,M,B1
		(B2) 0.1 mM	C1,A2,M,B2
		(B3) 0.5 mM	C1,A2,M,B3
		(B4) 1.0 mM	C1,A2,M,B4

Tabla 2.2. En el diseño factorial de los testigos positivos uretano y MMS (1.2 mM) se consideraron dos factores

(C) TESTIGOS POSITIVOS (URETANO ó MMS)	(D) SEXO (F) HEMBRAS (M) MACHOS
(C1) 0 mM	C1,F
	C1,M
(C2) 5 Mm (uretano)	C2,F
	C2,M
(C3) 10 mM(uretano)	C3,F
	C3,M
(C4) 20 mM (uretano)	C4,F
	C4,M
(C5) 1.2 mM (MMS)	C5,F
	C5,M

Tabla 2.3. Condiciones de tiempo, desarrollo de *D. melanogaster*, medios de cultivo, vehículos y tratamientos aplicados

Escala de tiempo (± 4 h)	Desarrollo	Medio de cultivo y vehículos	Pretratamiento	Manipulación mínima (s/m)	Post-tratamiento
0	Colecta huevos (8 h)	Levaduras vivas + azúcar	=	=	=
0-24	Embrión	No ingieren alimentos	=	=	=
24-48	Estadio larvario I	Levaduras vivas + azúcar	=	=	=
48-72	Estadio larvario II	Levadura seca en polvo, sacarosa 3% en agua	Sales de Ca^{2+} o Pb^{2+} en solución (testigo 0 mM)	Continúan en levaduras vivas + azúcar	Continúan en levaduras vivas + azúcar
72-74	Estadio larvario III	Tratamiento agudo: celulosa en polvo, sacarosa 3% en agua	MMS en solución (testigo 0 mM)	MMS en solución (testigo 0 mM)	MMS en solución (testigo 0 mM)
74-120	Estadio larvario III	Medio instantáneo rehidratado	=	=	Sales de Ca^{2+} o Pb^{2+} en solución (testigo 0 mM)
>120	Pupa	No ingieren alimentos	=	=	=
216-240	Emergencia de adultos		=	=	=

humedad hasta la emergencia total de los adultos. Para cada uno de los tratamientos se corrieron testigos paralelos (disolvente agua) con 0 mM de MMS.

Los testigos positivos con MMS y uretano se hicieron con sus correspondientes testigos paralelos con agua (Tablas 2.3 y 2.4). El objeto de hacerlos fue constatar si las líneas usadas en la cruce estándar mantenían regulado el citocromo P450. Los testigos con manipulación mínima c/mm se hicieron para observar si había efecto derivado de la manipulación a las 48-72 h de edad larvaria.

Pretratamiento (A1)

A las 48 h de edad larvaria se añadió agua corriente para coleccionar las larvas con la ayuda de una coladera metálica de poro pequeño. Se colocaron inmediatamente en una mezcla de levadura seca pulverizada y sacarosa al 3% sin sales metálicas (B1=0 mM) o con soluciones de la sal metálica (B2=0.1, B3=0.5 y B4=1 mM) preparadas en sacarosa al 3%, incubando posteriormente a 25°C y 65% de humedad durante 24 h. A las 72 h de vida se lavaron con agua corriente a temperatura ambiente y se pusieron en tubos de plexiglass con un extremo cubierto de organza de nylon. Dichos tubos se colocaron en recipientes con 2 ml de MMS (C1=12 mM) y 300 g de celulosa durante 2 h. Posteriormente se lavaron abundantemente las larvas con agua corriente y se distribuyeron por triplicado, en tubos de plexiglass con 1.5 g de medio instantáneo para *Drosophila* con 5 ml de agua bidestilada.

Post-tratamiento (A2)

A las 72 h de edad larvaria se añadió agua corriente para obtener las larvas de la manera antes descrita. Se colocaron inmediatamente en tubos de plexiglass con un extremo cubierto de organza de nylon para darles el tratamiento con 2 ml de MMS (C1=12 mM) y 300 g de celulosa durante 2 h. Posteriormente se lavaron abundantemente con agua corriente y se distribuyeron por triplicado en tubos de plexiglass con 1.5 g de medio instantáneo para *Drosophila* con 5 ml de agua bidestilada (B1=0 mM) o de las soluciones de la sal metálica (B2=0.1, B3=0.5 y B4=1 mM).

Testigos positivos MMS y uretano; testigos con manipulación mínima (c/mm)

A las 72 h de edad se añadió agua corriente para obtener las larvas de la manera ya descrita. Se pusieron de inmediato por triplicado, en tubos de plexiglass con 1.5 g de medio instantáneo para *Drosophila* y 5 ml de las soluciones de testigos positivos (C1=0 mM, de mutágenos, C2=5, C3=10 y C4= 20 mM de uretano y C5=1.2 mM de MMS).

Para detectar si hay efectos por la manipulación de las larvas en los pretratamientos a las 48 - 72 h de edad larval, se hicieron testigos con manipulación mínima (c/mm) paralelos a los pretratamientos. Para lograrlo, a larvas de 72 h sólo se les dio el tratamiento con agua bidestilada (B0=0 mM c/mm) ó con MMS (B0=12 mM c/mm) por 2 h. Se lavaron en agua corriente y se alimentaron en medio instantáneo para *Drosophila* con agua bidestilada, hasta la emergencia de los adultos.

2.5. Revisión de manchas por individuo

Los adultos se colocaron en recipientes con alcohol de 70%. La cruce estándar produce dos tipos de descendientes: *mwh + / + flr³* con alas fenotípicamente silvestres y *mwh + / TM3, Bd⁵* con alas de fenotipo serrata. Se revisaron las moscas para montar las alas silvestres de los individuos, por sexo y tratamiento, en preparaciones permanentes con la solución de Faure (goma arábica 30 g, glicerol 20 ml, hidrato cloral 50g, agua 50 ml) (van Schaik y Graf,

1991). Se analizaron las superficies dorsal y ventral del ala, al microscopio óptico a 400X, sin conocer el tratamiento al cual se habían sometido los individuos, para detectar sin prejuicios, la presencia de manchas simples: pequeñas y grandes, con fenotipo *mwh* o *flr* y manchas gemelas con fenotipo *mwh* y *flr* de acuerdo con Graf *et al.* (1984).

2.6. Análisis estadístico

Se compararon las frecuencias de manchas por individuo para evaluar el efecto de los tratamientos con o sin MMS mediante el paquete estadístico SMART de dos colas, fundamentado en la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Esta prueba es menos exigente que ANOVA porque los datos no requieren tener una distribución normal.

2.6.1. Recomendaciones para la acumulación de datos

Para un análisis experimental óptimo se acumularon los datos de los dos experimentos independientes manteniendo fijas sus proporciones. Se evitaron los falsos significativos (error tipo I) que pueden presentarse por la acumulación de los datos de los experimentos independientes, guardando a su vez las proporciones entre los números de moscas examinadas en los testigos y las series correspondientes de los experimentos independientes. Además con el objeto de controlar la sobredispersión debida al hecho de que en general, la población de las hembras tienen más manchas (0.68) que los machos (0.51), se mantuvieron constantes la proporciones de hembras y machos en los testigos y en las series de tratamientos (Frei y Würgler, 1995). En la mayoría de los experimentos se revisaron 55 o más individuos por tratamiento (APÉNDICE, Tablas 3.1 y 3.2)

2.6.2. Significados de la sobredispersión

En principio se espera que en la prueba en las alas *D. melanogaster*, los números de manchas por individuo sigan la distribución de Poisson por lo que la varianza es igual a la media. Gail en 1974 trabajó en la aproximación de esta distribución con la distribución normal (Frei y Würgler, 1995). La distribución de Poisson ocurre en los testigos no significativos, sin embargo, es común que después del tratamiento con un fuerte agente mutagénico, los resultados no sigan esa distribución. En esos casos la varianza es mayor que la media y el índice de dispersión, que es la relación varianza/media, tiene valores mayores de 1. Cuando esto sucede se considera que hay sobredispersión. La significancia de la sobredispersión se prueba con Ji cuadrada (Prueba de dispersión de Fisher). La sobredispersión se debe a una variabilidad individual en respuesta a factores externos e internos. Entre los factores internos están la pila génica y la sensibilidad a mutágenos. La concentración de exposición, la manipulación mecánica y la ingestión son factores externos o mixtos. Se considera que la ingestión variable es la causa principal extracelular de la sobredispersión (Frei y Würgler, 1995).

2.6.3. Representación gráfica de los resultados de SMART

En gráfica tridimensional de conos (EXCEL de Microsoft-Office para PC), se representó la frecuencia de manchas totales, pequeñas, grandes y gemelas contra la concentración de sales metálicas, en busca de una relación dosis-respuesta. Con la frecuencia de los clones *mwh*/individuo se hicieron gráficas de barras tridimensionales, contra el tamaño del clon. Se analizó la frecuencia más alta de los clones *mwh*, su tamaño (1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y >256 células) y su distribución. La frecuencia representa el número de eventos genotóxicos en las células del disco imagal. El tamaño de los clones *mwh* depende

genotóxico ocurrió en alguna de las células de los discos imagales que formaron las alas. A menor edad larvaria mayor tamaño de la mancha y a mayor edad larvaria menor tamaño de la mancha. La distribución refleja el número de divisiones que tuvieron lugar entre el momento del evento genotóxico y el final del crecimiento del disco imagal del ala (Graf, 1995). Por último, se muestran en gráficas lineales y de barras las frecuencias de manchas gemelas/individuo y gemelas/sexo para mostrar las diferencias que hay para ellas entre los factores y niveles.

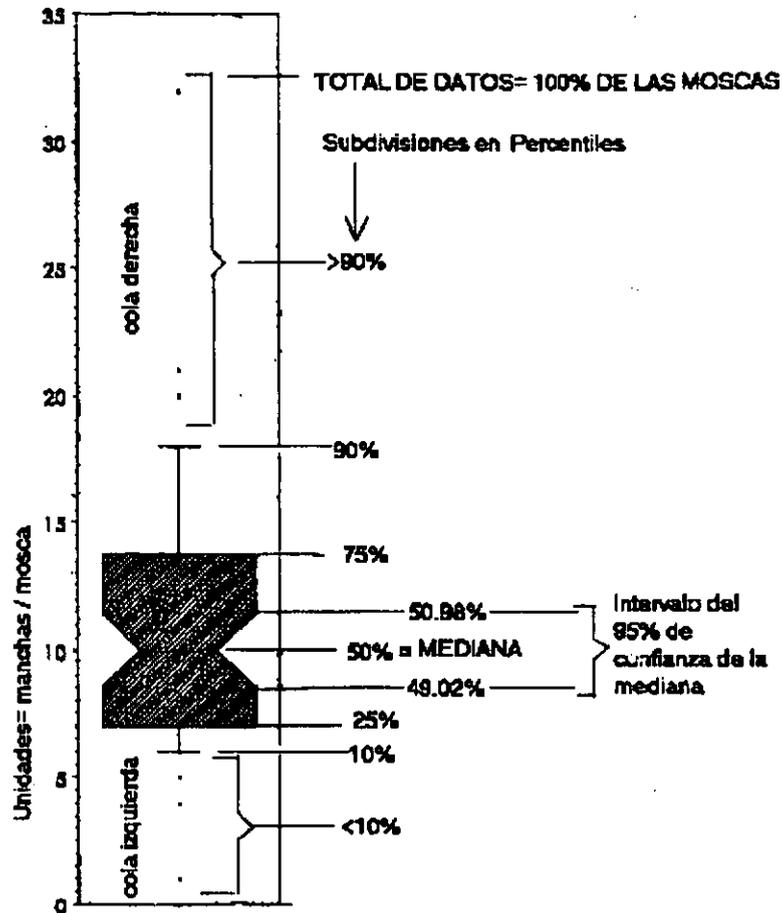
2.6.4. Transformación de datos para ANOVA factorial

Para contender con la sobredispersión se recomienda estadísticamente que los datos sean transformados para estabilizar la varianza en las ANOVA. La transformación en arcosenoh (h =hiperbólico) se aplicó a los datos del número total de manchas/individuo (y). Después del ANOVA se aplicó la aproximación *post-hoc* llamada método Bonferroni/Dunn (StatView, Macintosh) para encontrar con mayor detalle cuáles son las diferencias significativas entre las medias de grupos específicos que dieron las significancias en el ANOVA. Este método sigue los principios del método LSD (*Least Significance Difference*) y es un procedimiento de comparación múltiple para hacer posible todos los contrastes de pares entre una colección de medias. La aproximación *post-hoc* fue aplicada en ANOVA, para los niveles de significancia ($p = \alpha/n$), donde $\alpha = 0.05$ es el nivel nominal de significancia y n es el número de pares de medias comparadas (Frei, comunicación personal). Se aplicaron las pruebas no paramétricas de rangos: U y H (Kruskal-Wallis) con corrección para empates, con el propósito de validar las diferencias significativas, encontradas en las ANOVAS, entre los individuos sometidos a los tratamientos.

Con StatView de Macintosh se hicieron gráficas de las *interacciones* de las medias (arcosenoh de manchas totales/individuo) de los tratamientos con sus respectivos errores estándar. Éstas tienen líneas que unen a las medias de los diferentes tratamientos (pre y post-tratamientos, con y sin MMS) porque *representan gráficamente* ANOVA factorial.

2.6.5. Distribución de los individuos en la población

Con el objeto de mostrar la distribución y sobredispersión de las manchas totales/individuo se graficaron las frecuencias con el programa StatView para Macintosh. Este programa muestra la distribución en la población en gráficas de caja (*box-plots*). La caja (Fig. 2.2) representa los 10, 25, 50, 75 y 90 percentiles de la distribución. La caja está delimitada por los percentiles 25 y 75. Los percentiles 10 y 90 están representados por líneas que salen de los límites de los percentiles 25 y 75. Los puntos por abajo y por arriba de esas líneas representan los valores individuales que sobrepasan a los percentiles 10 y 90. La caja tiene una línea transversal que la corta, la cual es la mediana (percentil 50), con un error estándar ($p < 0.05$) que forma ángulos a ambos lados de la caja y convergiendo en la mediana. Cuando la distribución por arriba o por debajo de la mediana tiene los mismos valores, el programa marca unas prolongaciones en forma de picos. Los valores iguales se grafican juntos, por lo cual en ocasiones no se muestran los percentiles o éstos se ven muy cortos. Si no se observa la caja significa que 75% o más individuos carecen de manchas. Si la caja está presente, pero no se señala la mediana, implica que 50% o más, pero menos de 75% de las moscas, tienen cero manchas.



La mediana muestral se ubica en el área entre \pm un error estándar

Fig.2.2. La distribución del total de manchas / individuo en las gráficas de caja señala el sitio de los percentiles, las medianas y el error estándar ($p < 0.05$) (ver texto).

2.7. Consultas en FlyBase-Listings 2001

La Universidad de Harvard mantiene un sitio en Internet denominado FlyBase-Listings 2001 (ff., <http://flybase.bio.indiana.edu:82/>) al cual se tiene acceso libre y en el que se pueden hacer consultas sobre cualquier gen, producto, función o característica relacionada con *D. melanogaster*. Para este trabajo se consultó exhaustivamente y hasta el 16 de febrero del 2001 dicho sitio, con el objeto de identificar los genes involucrados con los mecanismos de reparación del ADN. Se investigó especialmente sobre los hipersensibles a MMS y al estrés oxidante, si se expresan de manera diferente en las hembras y en los machos, si aumentan espontáneamente la frecuencia de manchas en moscas *mwh/+* y si su función es dependiente de la presencia de cationes divalentes, como el Mg^{2+} o tienen motivos de Zn^{2+} (APENDICE, Tablas 1.1 y 1.2)

3. RESULTADOS

3.1. Análisis estadístico con SMART (Prueba de U, Wilcoxon- Mann- Whitney)

En las gráficas 3.1 a 3.10 y Tablas 3.1 y 3.2 se muestran los resultados obtenidos con el paquete SMART para dos colas con la Prueba de U (Wilcoxon-Mann-Whitney) (Frei y Würgler, sin publicar) del número de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales encontradas en cada uno de los individuos sometidos a las series de tratamientos. En las series tratadas sin MMS (C0) y con nitrato de Ca no hubo significancias con esta prueba. En las series sin MMS (C0) y con nitrato de Pb se obtuvieron dos resultados significativos. Todas las series tratadas con MMS (C1) mostraron significancias, de manera consistente y de acuerdo con el efecto genotóxico esperado al administrar este agente alquilante. La modulación de esta respuesta por los iones Pb^{2+} y Ca^{2+} no fue demostrada de manera consistente, ya que los valores significativos se presentaron sólo en algunos tipos de manchas y sin una clara relación concentración-respuesta.

Significancias en la Prueba de U de dos colas (SMART)

Las significancias en las frecuencias de manchas/individuo que se observaron al aplicar la prueba de U de dos colas (SMART) (Frei y Würgler, sin publicar) fueron las siguientes:

Frecuencias significativamente menores que los testigos agua ó MMS:

Sólo se observaron cinco diferencias significativas en el número de manchas, que fueron menores que el testigo agua (B1= 0 mM) o MMS (B1=12 mM) de los pretratamientos. Cuatro de ellas corresponden a testigos con manipulación mínima (B0, c/mm) sin metales y una al pretratamiento con Pb^{2+} 1 mM y MMS (C1,A1,B4):

1. Manchas pequeñas en pretratamiento Pb (B0, c/mm - 0 mM)
2. Manchas grandes y total de manchas en pretratamiento Ca, MMS (B0, c/mm -12 mM)
3. Manchas grandes en pretratamiento Pb, MMS (B0, c/mm -12 mM)
4. Total de manchas en pretratamiento Pb, MMS (1 mM -12 mM)

Las bajas frecuencias en algunos valores de los testigos con manipulación mínima (B0, c/mm) hacen evidente la ausencia de un efecto. Podría pensarse que la disminución en el total de manchas del pretratamiento con Pb 1mM y MMS es resultado de una modulación del Pb^{2+} a esa concentración, sobre el efecto genotóxico del MMS. Esta posibilidad se analizó con ANOVA factorial y pruebas no paramétricas.

Sólo en manchas grandes de MMS, Ca (B0, c/mm - 12 mM) y en manchas pequeñas del post-tratamiento MMS, Ca (12 mM -1 mM) se obtuvieron significancias. Se volvió a encontrar una tendencia a la disminución de manchas en los testigos con manipulación mínima (B0, c/mm) sin metales y con MMS. La disminución de manchas pequeñas a la concentración de 1 mM. de nitrato de Ca podría sugerir un efecto modulador del metal. Para comprobarlo se analizaron los datos con ANOVA factorial y pruebas no paramétricas.

Frecuencias significativamente mayores que el testigo agua o MMS:

La única frecuencia mayor que los testigos agua (B1=0 mM) o MMS (B1=12 mM) se obtuvo en las manchas pequeñas del testigo con manipulación mínima del post-tratamiento MMS,

Pb (B0, c/mm -12 mM). Sin embargo el valor significativamente mayor en las manchas pequeñas no tuvo efecto en el total de manchas.

Frecuencias significativamente mayores en los testigos positivos uretano y MMS:

De acuerdo a lo esperado los testigos positivos uretano y MMS mostraron significancia positivamente mayor en la mayoría de las series:

1. Manchas pequeñas y total de manchas en uretano (5, 10 mM)
2. Manchas pequeñas, gemelas y total de manchas en uretano (20 mM)
3. Manchas pequeñas, grandes, gemelas y total de manchas en MMS (1.2 mM).

Las frecuencias obtenidas de manchas totales con las concentraciones de uretano (C2=5, C3=10 y C4=20 mM) fueron comparativamente menores (2.4, 2.4 y 4.1 respectivamente) que la frecuencia de manchas totales con MMS C5=1.2 mM (43.133). Con la dosis 20 mM de uretano se dobla la frecuencia de manchas obtenida con 5 y 10 mM.

Tabla 3.1. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DEL ALA CON *Drosophila melanogaster* ALIMENTADA CON MMS y Ca²⁺ o Pb²⁺

Testigos y tratamientos						
Frecuencia de manchas (Número de manchas)			Prueba de U(2-colas)*			
Dosis mM	Indiv	Manchas pequeñas	Manchas grandes	Manchas gemelas	Total de manchas	Clones <i>mwh</i>
Nitrato de calcio						
Testigo:						
Pretratamiento Ca-MMS (0-0 mM)						
0	56	0.625 (35)	0.107 (6)	0.036 (2)	0.768 (43)	0.768 (43)
Experimento 1:						
Pretratamiento manipulación mínima - MMS (c/mm- 0 mM)						
0 c/mm	56	0.464 (26)ns	0.125 (7)ns	0.036 (2)ns	0.625 (35)ns	0.607 (34)ns
Experimento 2:						
Pretratamiento Ca-MMS (1-0 mM)						
1.0	56	0.536 (30)ns	0.125 (7)ns	0.000 (0)ns	0.661 (37)ns	0.643 (36)ns
Experimento 3:						
Pretratamiento Ca-MMS (0.5-0 mM)						
0.5	56	0.911 (51)ns	0.161 (9)ns	0.018 (1)ns	1.089 (61)ns	1.089 (61)ns
Experimento 4:						
Pretratamiento Ca-MMS (0.1-0 mM)						
0.1x24	56	0.750 (42)ns	0.196 (11)ns	0.143 (8)ns	1.089 (61)ns	1.089 (61)ns

Testigo:						
Post-tratamiento MMS-Ca (0-0 mM)						
0	56	0.411 (23)	0.089 (5)	0.036 (2)	0.536 (30)	0.536 (30)
Experimento 1:						
Post-tratamiento manipulación mínima -MMS (c/mm-0 mM)						
0 c/mm	56	0.464 (26)ns	0.089 (5)ns	0.036 (2)ns	0.589 (33)ns	0.589 (33)ns
Experimento 2:						
Post-tratamiento MMS-Ca (0-1.0 mM)						
1.0	55	0.491 (27)ns	0.073 (4)ns	0.036 (2)ns	0.600 (33)ns	0.600 (33)ns
Experimento 3:						
Post-tratamiento MMS-Ca (0-0.5 mM)						
0.5	56	0.393 (22)ns	0.071 (4)ns	0.054 (3)ns	0.518 (29)ns	0.500 (28)ns
Experimento 4:						
Post-tratamiento MMS-Ca (0-0.1 mM)						
0.1	55	0.491 (27)ns	0.073 (4)ns	0.036 (2)ns	0.600 (33)ns	0.600 (33)ns

Nitrato de calcio y MMS

Testigo:						
Pretratamiento Ca-MMS (0-12 mM)						
0	55	1.709 (94)	5.164 (284)	3.891 (214)	10.764 (592)	10.218 (562)
Experimento 1:						
Pretratamiento manipulación mínima-MMS (c/mm-12 mM)						
0 c/mm	55	1.945 (107)ns	3.145 (173)***	3.291 (181)ns	8.382 (461)*	8.164 (449)ns
Experimento 2:						
Pretratamiento Ca-MMS (1.0-12 mM)						
1.0	55	2.455 (35)ns	5.764 (317)ns	4.982 (274)ns	13.200 (726)ns	12.582 (692)ns
Experimento 3:						
Pretratamiento Ca-MMS (0.5-12 mM)						
0.5	27	2.370 (64)ns	4.556 (123)ns	4.556 (123)ns	11.481 (310)ns	11.148 (301)ns
Experimento 4:						
Pretratamiento Ca-MMS (0.1-12 mM)						
0.1	59	1.983 (117)ns	5.356 (316)ns	4.305 (254)ns	11.644 (687)ns	10.915 (644)ns

Testigo:						
Post-tratamiento MMS-Ca (12-0 mM) STMCa4-7						
0	66	2.106 (139)	4.348 (287)	3.348 (221)	9.803 (647)	9.318 (615)
Experimento 1:						
Post-tratamiento manipulación mínima-MMS (c/mm-12 mM)						
0 c/mm	66	1.955 (129)ns	3.227 (213)**	3.152 (208)ns	8.333 (550)ns	8.136 (537)ns
Experimento 2:						
Post-tratamiento MMS-Ca (12-1.0 mM)						
1	66	1.348 (89)*	4.258 (281)ns	3.500 (231)ns	9.106 (601)ns	8.455 (558)ns
Experimento 3:						
Post-tratamiento MMS-Ca (12-0.5 mM)						
0.5	66	2.424 (160)ns	4.530 (299)ns	3.727 (246)ns	10.682 (705)ns	10.303 (680)ns
Experimento 4:						
Post-tratamiento MMS-Ca (12-0.1 mM)						
0.1	62	2.677 (166)ns	4.258 (264)ns	4.468 (277)ns	11.403 (707)ns	10.968 (680)ns

Nitrato de plomo

Testigo:						
Pretratamiento Pb-MMS (0-0 mM)						
0	59	0.864 (51)	0.085 (5)	0.000 (0)	0.949 (56)	0.932 (55)
Experimento 1:						
Pretratamiento manipulación mínima-MMS (c/mm-0 mM)						
0 c/mm	59	0.441 (26)*	0.119 (7)ns	0.034 (2)ns	0.593 (35)ns	0.576 (34)ns
Experimento 2:						
Pretratamiento Pb-MMS (1-0 mM)						
1.0	59	0.746 (44)ns	0.119 (7)ns	0.085 (5)*	0.949 (56)ns	0.915 (54)ns
Experimento 3:						
Pretratamiento Pb-MMS (0.5-0 mM)						
0.5	59	0.542 (32)ns	0.119 (7)ns	0.017 (1)ns	0.678 (40)ns	0.661 (39)ns
Experiment 4:						
Pretratamiento Pb-MMS (0.1-0 mM)						
0.1	59	0.559 (33)ns	0.220 (13)ns	0.017 (1)ns	0.797 (47)ns	0.797 (47)ns

Testigo:						
Post-tratamiento MMS-Pb (0-0 mM)						
0	78	0.308 (24)	0.064 (5)	0.038 (3)	0.410 (32)	0.385 (30)
Experimento 1:						
Post-tratamiento manipulación mínima-MMS (c/mm-0 mM)						
0 c/mm	57	0.474 (27)ns	0.088 (5)ns	0.035 (2)ns	0.596 (34)ns	0.596 (34)ns
Experimento 2:						
Post-tratamiento MMS-Pb (0-1 mM)						
1	64	0.422 (27)ns	0.094 (6)ns	0.031 (2)ns	0.547 (35)ns	0.547 (35)ns
Experimento 3:						
Post-tratamiento MMS-Pb (0-0.5 mM)						
0.5	66	0.561 (37)ns	0.045 (3)ns	0.045 (3)ns	0.652 (43)ns	0.652 (43)ns
Experimento 4:						
Post-tratamiento MMS-Pb (0-0.1 mM)						
0.1	68	0.368 (25)ns	0.074 (5)ns	0.059 (4)ns	0.500 (34)ns	0.500 (34)ns

Dosis mM	Indiv	Manchas pequeñas	Manchas grandes	Manchas gemelas	Total de manchas	Clones <i>mwh</i>
----------	-------	------------------	-----------------	-----------------	------------------	-------------------

Nitrato de plomo y MMS

Testigo:						
Pretratamiento Pb-MMS (0-12 mM)						
0	58	1.862 (108)	4.431 (257)	3.810 (221)	10.103 (586)	9.707 (563)
Experimento 1:						
Pretratamiento manipulación mínima-MMS (c/mm-12 mM)						
0 c/mm	62	1.984 (123)ns	3.065 (190)***	3.048 (189)ns	8.097 (502)ns	7.887 (489)ns
Experimento 2:						
Pretratamiento Pb-MMS (1-12 mM)						
1.0	55	1.509 (83)ns	4.145 (228)ns	2.418 (133)ns	8.073 (444)*	7.618 (419)*
Experimento 3:						
Pretratamiento Pb- MMS (0.5-12 mM)						
0.5	44	1.568 (69)ns	4.864 (214)ns	3.523 (155)ns	9.955 (438)ns	9.341 (411)ns
Experimento 4:						
Pretratamiento Pb- MMS (0.1-12 mM)						
0.1	46	1.348 (62)ns	3.652 (168)ns	3.174 (146)ns	8.174 (376)ns	7.674 (353)ns

Testigo:						
Post-tratamiento MMS-Pb (12-0 mM)						
0	56	1.268 (71)	3.179 (178)	3.196 (179)	7.643 (428)	7.179 (402)
Experimento 1:						
Post-tratamiento manipulación mínima-MMS (c/mm-12 mM)						
0 c/mm	61	1.770 (108)*	3.180 (194)ns	2.770 (169)ns	7.721 (471)ns	7.508 (458)ns
Experimento 2:						
Post-tratamiento MMS-Pb (12-1 mM)						
1.0	48	1.333 (64)ns	2.750 (132)ns	2.979 (143)n	7.063 (339)ns	6.646 (319)ns
Experimento 3:						
Post-tratamiento MMS-Pb (12-0.5 mM)						
0.5	62	1.484 (92)ns	3.016 (187)ns	3.016 (187)ns	7.516 (466)ns	7.226 (448)ns
Experimento 4:						
Post-tratamiento MMS-Pb (12-0.1mM)						
0.1	56	1.571 (88)ns	3.714 (208)ns	3.464 (194)ns	8.750 (490)ns	8.357 (468)ns

*, Prob <= 0.05; **, Prob <= 0.01; ***, Prob <= 0.001; ns, no significativo

Tabla 3.2. Resumen de los resultados obtenidos con la prueba del ala con *Drosophila melanogaster* alimentada a las 72 h de edad con uretano y MMS hasta el III estadio larval.

Testigos y tratamientos						
Frecuencia de manchas (Número de manchas)			Prueba de U(2-colas)*			
Dosis MM	Indiv	Manchas pequeñas	Manchas grandes	Manchas gemelas	Total de manchas	Clones mwh
Testigos:(0 mM)						
0	30	0.433(13)	0.100(3)	0.000(0)	0.533(16)	0.533 (16)
Experimento 1:						
Tratamiento 72 h Uretano (5 mM)						
5	30	2.067(62)***	0.200(6)ns	0.133(4)ns	2.400(72)***	2.367 (71)***
Experimento 2:						
Tratamiento 72 h Uretano (10 mM)						
10	30	2.100(63)***	0.267(8)ns	0.067(2)ns	2.433(73)***	2.433 (73)***
Experimento 3:						
Tratamiento 72 h Uretano (20 mM)						
20	30	3.433(103)***	0.433(13)ns	0.233(7)*	4.100(123)***	4.100 (123)***
Experimento 4:						
Tratamiento 72 h MMS (1.2 mM)						
1.2	31	11.633(349)***	16.900(507)***	14.600(438)***	43.133(1294)***	42.267 (1268)***

*, Prob <= 0.05; **, Prob <= 0.01; ***, Prob <= 0.001; ns, no significativo

Frecuencia de manchas en las series tratadas con calcio y plomo

Las frecuencias de manchas en los tratamientos sin MMS fueron de pequeñas, grandes y gemelas (Figs.3.1 y 3.2) y con MMS fue de grandes, gemelas y pequeñas (Figs. 3.3 y 3.4).

Las frecuencias de manchas en los tratamientos con Pb^{2+} sin MMS se comportaron igual que con el calcio: pequeñas, grandes y gemelas (Figs 3.5 y 3.6). Con MMS las frecuencias fueron grandes, gemelas y pequeñas (Figs.3.7 y 3.8). Las frecuencias de manchas pequeñas, grandes y gemelas en las series sin MMS indican, por la mayor cantidad de manchas pequeñas, que el daño inducido o espontáneo tuvo lugar en etapas tardías del desarrollo larvario. Las

frecuencias de manchas grandes, gemelas y pequeñas en las series con MMS se explica, porque las manchas grandes son resultado de la clonación de un evento genotóxico más temprano en el disco imagal del ala. Esto confirma la acción alquilante directa del MMS.

Frecuencias de manchas en los testigos positivos MMS y uretano

Las frecuencias de manchas con el testigo MMS fue de grandes, gemelas y pequeñas (Fig.3.9). Con uretano el orden fue pequeñas, grandes y gemelas (Fig.3.10).

La frecuencia de manchas pequeñas, grandes y gemelas en las series con uretano indica por la mayor cantidad de manchas pequeñas, que el daño inducido o espontáneo tuvo lugar en las últimas etapas del desarrollo larvario. Este efecto coincide con la definición del uretano como promutágeno que requiere ser bioactivado en dos fases del citocromo P450. Una vez activado produce aductos de purina tricíclicos o dobles anillos de citidina. Para que ocurra lo anterior esta sustancia debe ser estable en el agua. Este promutágeno actúa hasta el tercer estadio larvario por lo que se esperaba que el número de manchas en estos testigos resultara notablemente menor que con MMS, en la cruz estándar.

Las frecuencias de manchas grandes, gemelas y pequeñas en las series con MMS coinciden con la acción directa del mutágeno en etapas tempranas del desarrollo larval. Como se ha mencionado, las manchas grandes son resultado de la clonación de un evento genotóxico más temprano en el disco imagal del ala (Graf, 19). Este agente alquilante directo no requiere bioactivación y produce bases metiladas desde el momento en que entra a la célula. Por lo anterior el número de manchas fue mayor en los individuos tratados con MMS que en los individuos tratados con uretano

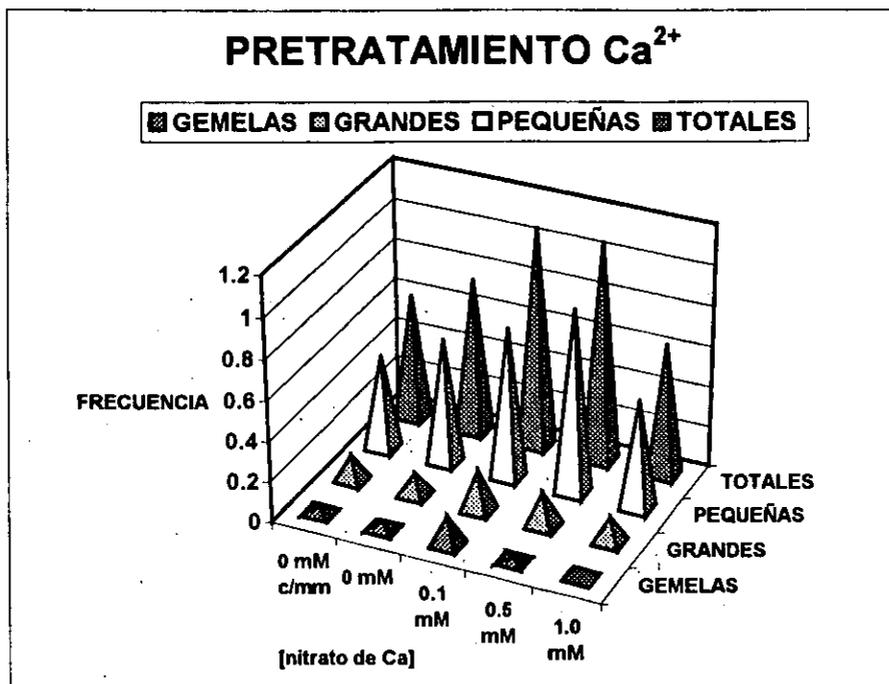


Fig. 3.1. Frecuencia de manchas después de alimentar larvas de 48 h con nitrato de calcio (0, 0.1, 0.5, 1 mM) por 24 h. Con SMART no hay diferencias significativas entre las frecuencias de las manchas.

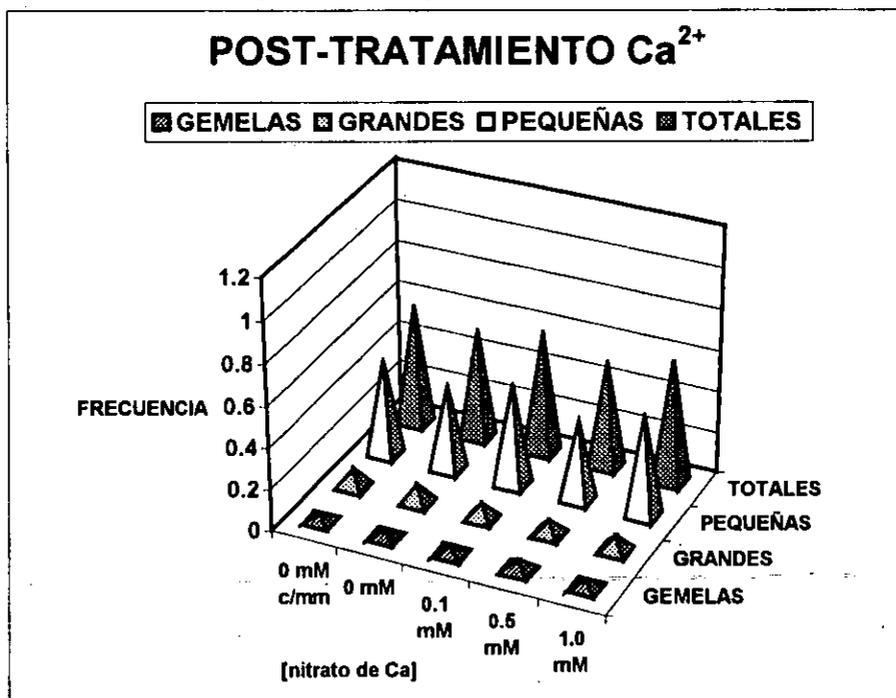


Fig. 3.2. Frecuencia de manchas después de alimentar larvas de 74 h con nitrato de calcio (0, 0.1, 0.5, 1 mM) hasta el final del III estadio. Con SMART no hay diferencias significativas entre las frecuencias de las manchas.

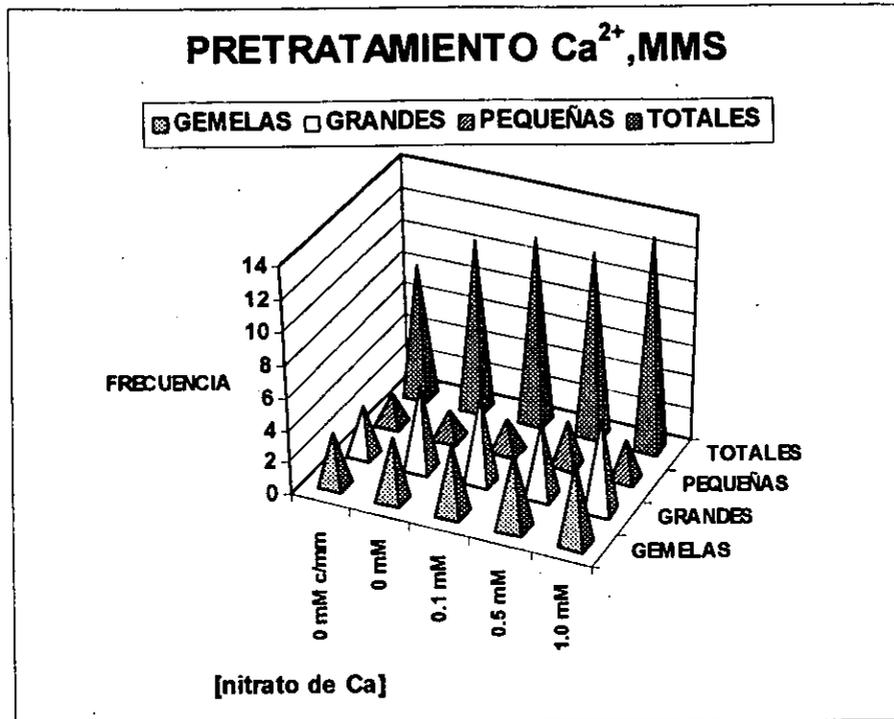


Fig. 3.3. Frecuencia de manchas después de alimentar larvas de 48 h con nitrato de calcio (0, 0.1, 0.5, 1 mM) por 24 h y MMS de las 72 a las 74 h. Con SMART las grandes y totales del testigo 0 mM c/mm son significativamente menores.

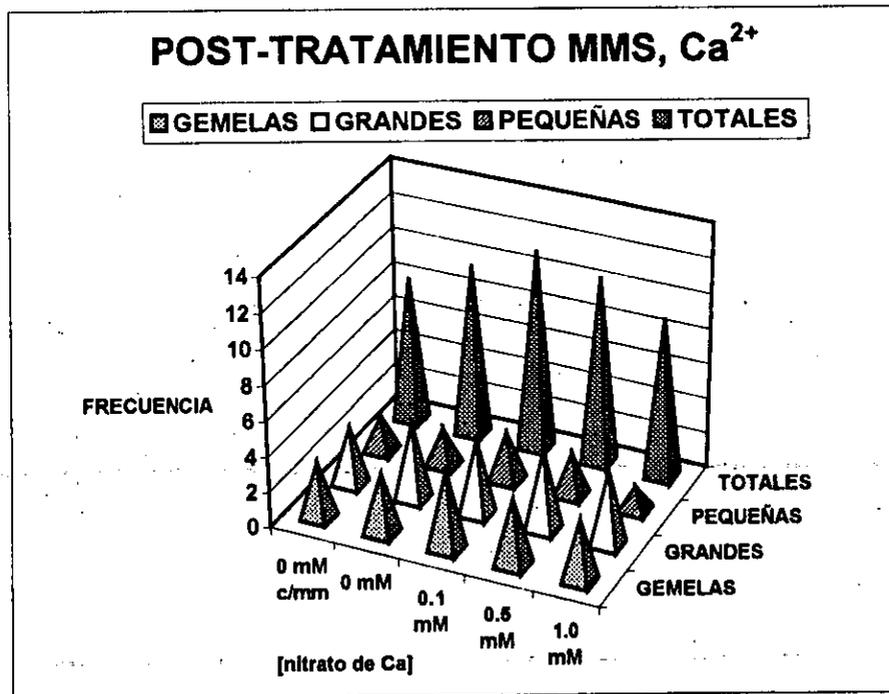


Fig. 3.4. Frecuencia de las manchas después de alimentar larvas de 72 h con MMS por 2 h y el post-tratamiento con nitrato de calcio (0, 0.1, 0.5 1 mM) de las 74 h hasta el final del III estadio. Con SMART las grandes de 0 mM c/mm y pequeñas de 1 mM son significativamente menores.

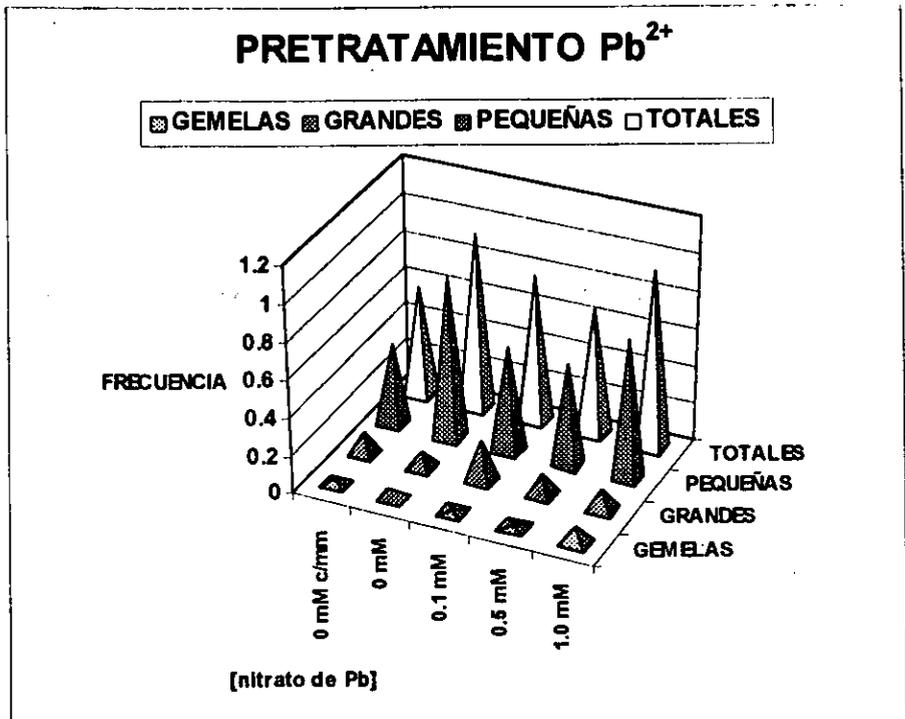


Fig. 3.5. Frecuencia de manchas después de alimentar larvas de 48 h con nitrato de plomo (0, 0.1, 0.5 y 1 mM) por 24 h. Con SMART las pequeñas de 0 mM c/mm son significativamente menores y las gemelas de 1 mM son mayores.

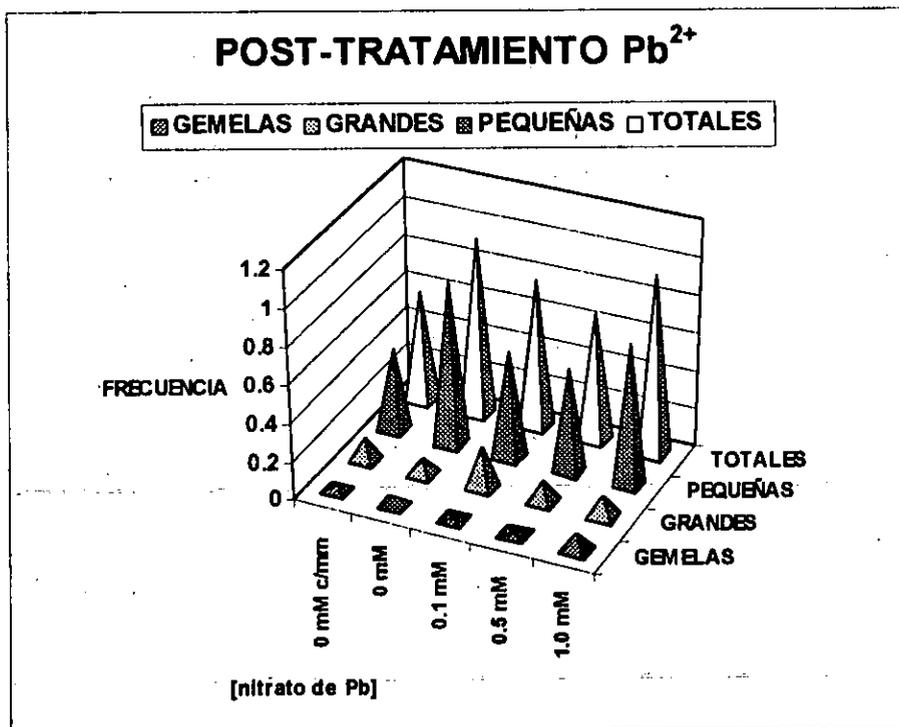


Fig. 3.6. Frecuencia de manchas después de alimentar larvas de 74 h con nitrato de plomo (0, 0.1, 0.5, 1 mM) hasta el final del III estadio. Con SMART no se obtuvieron resultados significativos.

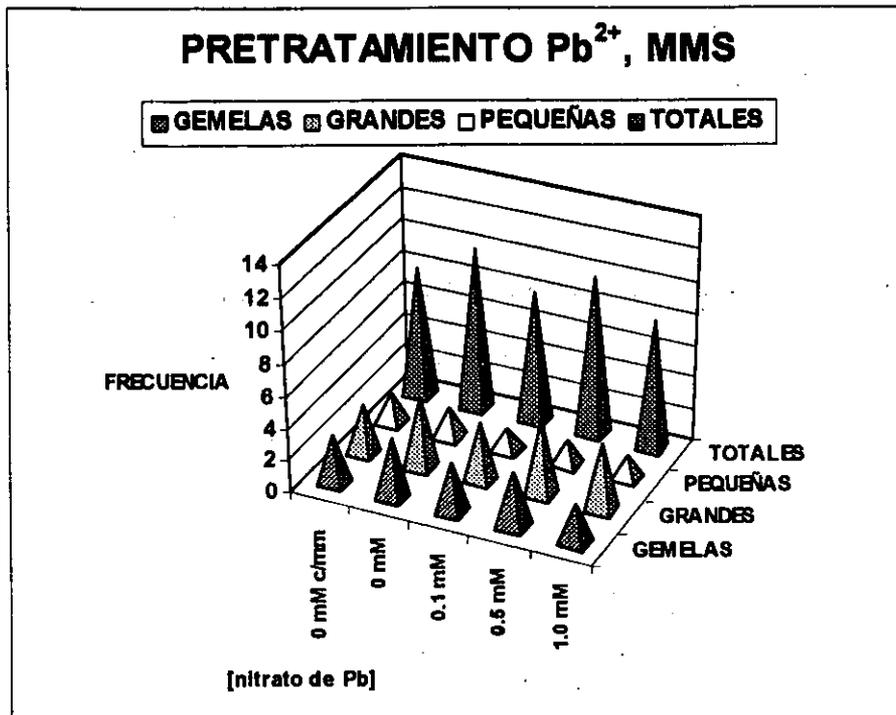


Fig. 3.7. Frecuencia de manchas después de alimentar larvas de 48 h con nitrato de plomo (0, 0.1, 0.5, 1 mM) por 24 h y MMS (12 mM) de las 72 a las 74 h. Con SMART son significativamente menores las grandes de 0 mM c/mm y las totales de 1 mM.

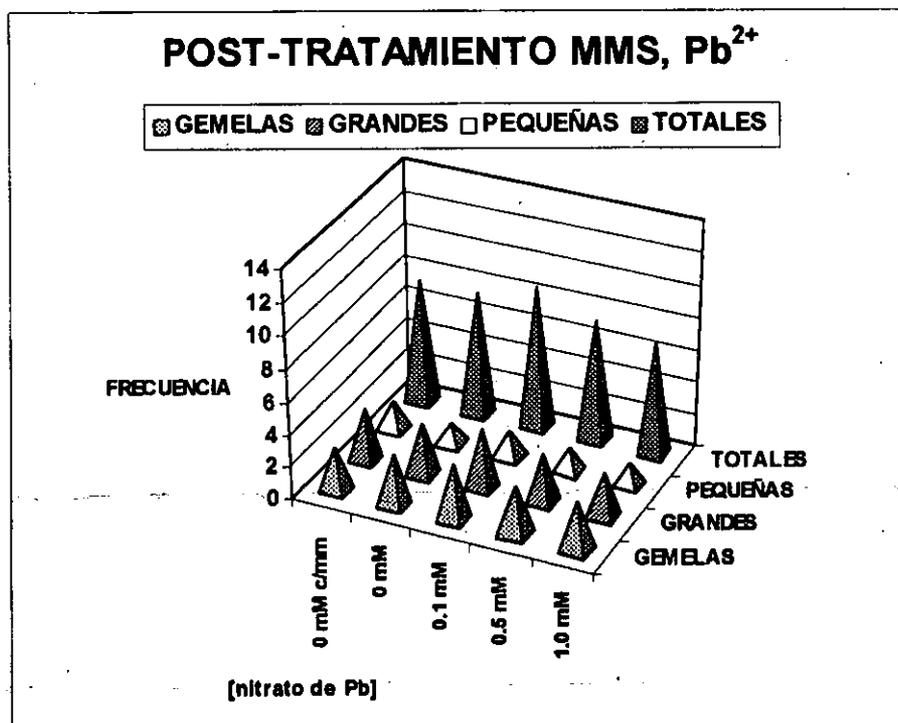


Fig. 3.8. Frecuencia de manchas después de alimentar larvas de 72 h con MMS (12 mM) por 2 h y el post-tratamiento con nitrato de plomo (0, 0.1, 0.5, 1 mM) de las 74 h al final del III estadio. Con SMART las pequeñas de 0 mM c/mm son significativamente menores.

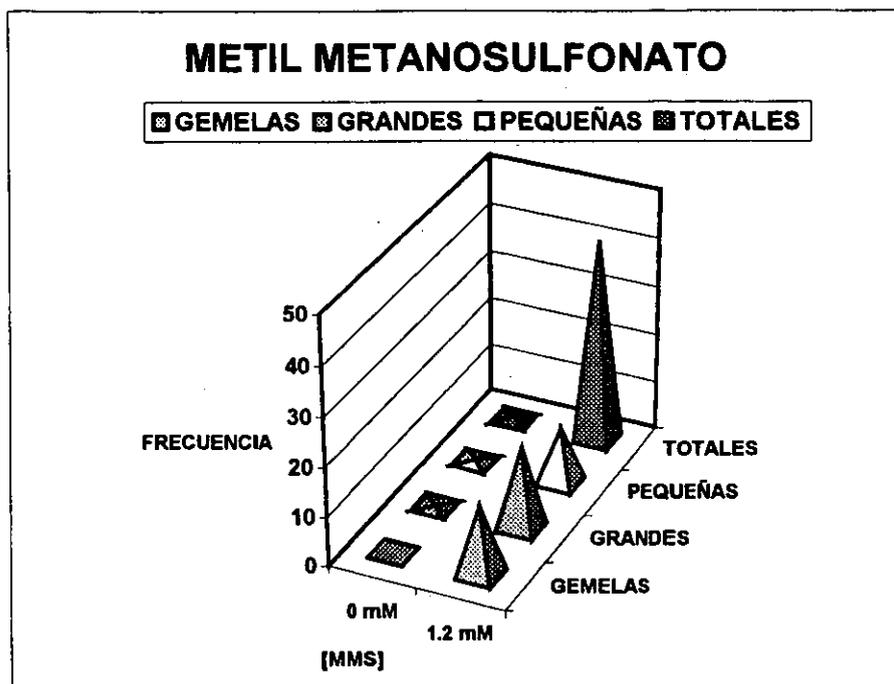


Fig. 3.9. Frecuencia de manchas en larvas alimentadas con MMS (0, 1.2 mM) de las 72 h hasta el final del III estadio. Con SMART todas las frecuencias son significativas y los valores más altos corresponden a las manchas grandes.

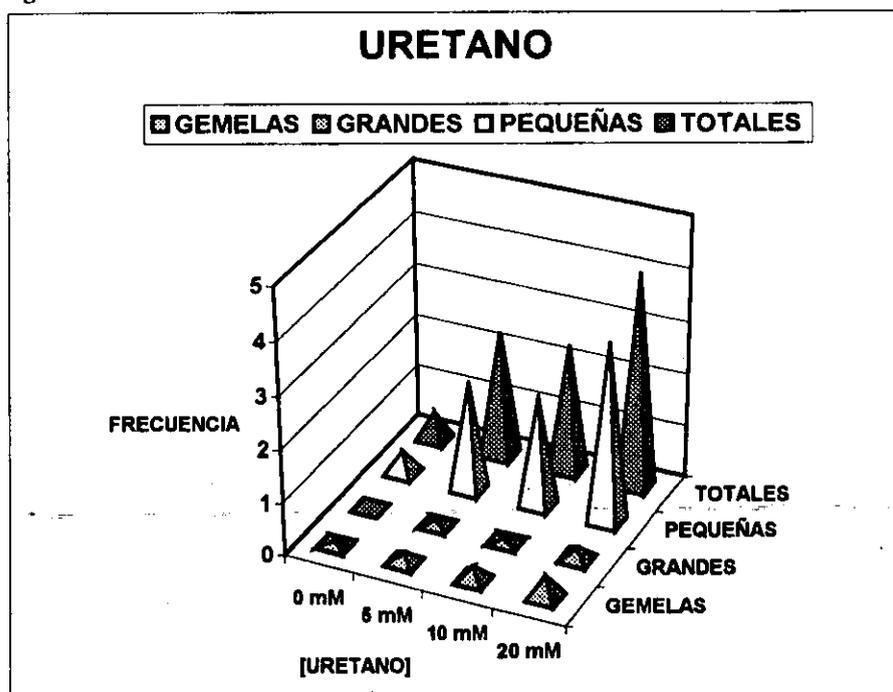


Fig. 3.10. Frecuencia de manchas en larvas alimentadas con uretano (0, 5, 10, 20 mM) de las 72 h hasta el final del III estadio. Con SMART hay resultados significativamente mayores en todas las totales y todas las pequeñas. Sólo con 20 mM las gemelas fueron significativamente mayores.

3.2. Jicuada y sobredispersión de las manchas totales

Se determinó la significancia de la sobredispersión de las manchas totales/individuo con la prueba Ji cuadrada de Fisher (Frei y Würigler, 1995) cuya fórmula es:

$$X^2 = \text{Suma} \{ [(X(i) - \text{media})^2] / \text{media} \}$$

Donde la suma es de todas las moscas (i) con i-1 grados de libertad. Los valores de X(i) son el número de manchas en los pares de alas de cada individuo. La prueba es de una cola porque sólo se busca la sobredispersión y se aplica al número de manchas totales/individuo, no a las proporciones como es el caso de la prueba SMART basada en ji cuadrada. En la mayoría de los tratamientos sin MMS (con nitratos y los testigos agua), no se encontró significancia para la sobredispersión de los datos. Sólo tres casos mostraron con Ji cuadrada sobredispersión de las manchas totales:

Pretratamiento con 0.1 mM Ca^{2+} ($p < 0.001$)
Post-tratamiento con 0.1 mM Ca^{2+} ($p = 0.016$)
Post-tratamiento con 1 mM Pb^{2+} ($p = 0.022$)

Los resultados indican que los datos siguen la distribución de Poisson (con aproximación a la normal) esperada en la mayoría de los tratamientos y no existe efecto genotóxico provocado por los nitratos. Los tres casos encontrados podrían ser producidos por diferentes razones: un efecto por el aumento de los iones Ca^{2+} y Pb^{2+} en el espacio extra e intracelular, por la presencia de individuos con un gran o escaso número de manchas y/o por causas no controladas en los experimentos (errores de observación, fenocopias, confusión de individuos, etc.).

Como era de esperarse, en las series con MMS hubo sobredispersión altamente significativa ($p << 0.001$) en todos los casos en los que se aplicó Ji cuadrada. Debido a que el tratamiento en las series fue de solamente 2 horas debemos considerar que esta condición es particularmente crítica porque algunas de las larvas pudieron comer muy bien durante este período, mientras que otras pudieron no haberlo hecho. La alimentación crónica podría permitir mayor uniformidad entre los individuos. La experiencia ha mostrado que aún los experimentos crónicos con mutágenos fuertes provocan sobredispersión y ésta también se relaciona con la genotoxicidad del agente que se administra.

3.3. Anova factorial, Bonferroni/Dunn, Pruebas de H y de U

La gran variabilidad individual en las series tratadas con MMS pudo oscurecer pequeñas diferencias sistemáticas entre las series de tratamiento. La sobredispersión debe ser considerada al analizar los datos con una prueba paramétrica como ANOVA. Para lidiar con ella, incluyendo la observada en los datos altamente significativos y en los no significativos que siguen la distribución de Poisson, se recomienda estadísticamente transformarlos. Por lo anterior es que los datos de manchas totales/individuo(y) se convirtieron en arcosenoh (h=hipérbola) antes de aplicar las pruebas de ANOVA factorial, el método de Bonferroni/ Dunn y las pruebas de rangos de H y de U.

3.3.1. Nitrato de calcio

La prueba de ANOVA factorial para manchas totales/individuo obtenidas con las series de tratamientos con el calcio, mostró efecto de los cuatro factores (MMS, Ca, Tratamiento y Sexo) e interacciones de primer y segundo orden (APÉNDICE, Tabla 3.3)

El Ca resultó significativo y esto se debió a que son menores las frecuencias del testigo con manipulación mínima (B0) 0 mM c/mm que las del testigo agua (B1) 0 mM y de las series tratadas con calcio (Fig. 3.11 y 3.13). Lo anterior se comprobó al hacer ANOVA sin el testigo (B0) 0 mM c/mm y obtener una $p = 0.46$. El factor Sexo fue altamente significativo porque hay mayor número de manchas en las hembras, aún en los testigos agua sin nitratos (Fig. 3.14, B1).

Frecuencia de manchas totales en los individuos

La interacción de segundo orden MMS * Ca * Tratamiento se muestra en la Fig. 3.11 La frecuencia de manchas en los individuos de los pretratamientos (con y sin MMS) fue mayor que en los post-tratamientos. En los tratamientos con MMS (C1) la frecuencia fue mayor que sin MMS (C0).

Frecuencia del total de manchas por sexo / individuo

La interacción de tercer orden MMS * Ca * Tratamiento * Sexo se muestra en la Fig. 3.12. Sin MMS (C0) hay valores mayores en las hembras de (B1) 0 mM y (B2) 0.1 mM del pretratamiento (A1) y en (B2) 0.1 mM del post-tratamiento (A2). Con MMS (C1), hay mayor número de manchas en hembras, excepto en (B1) 0 mM del pretratamiento.

Distribución de manchas totales/individuos en ANOVA global

Con MMS (C1) las medianas en el pretratamiento (A1) son mayores que en el post-tratamiento (A2). La diferencia en la distribución por efecto de la manipulación de las larvas se muestra al comparar (B0) 0 mM c/mm y (B1) 0 mM del pretratamiento (A1) (Fig 3.13).

Distribución de manchas totales/sexo/individuo

Con MMS (C1) las medianas de las hembras son superiores y la asimetría provoca su distribución hacia la derecha con mayor extensión que en los machos (Fig. 3.14)

EFFECTO: (C) MMS * (B) Ca * (A) TRATAMIENTO
 Interacción para arcosenoh(y) Barras: ± 1 error estándar

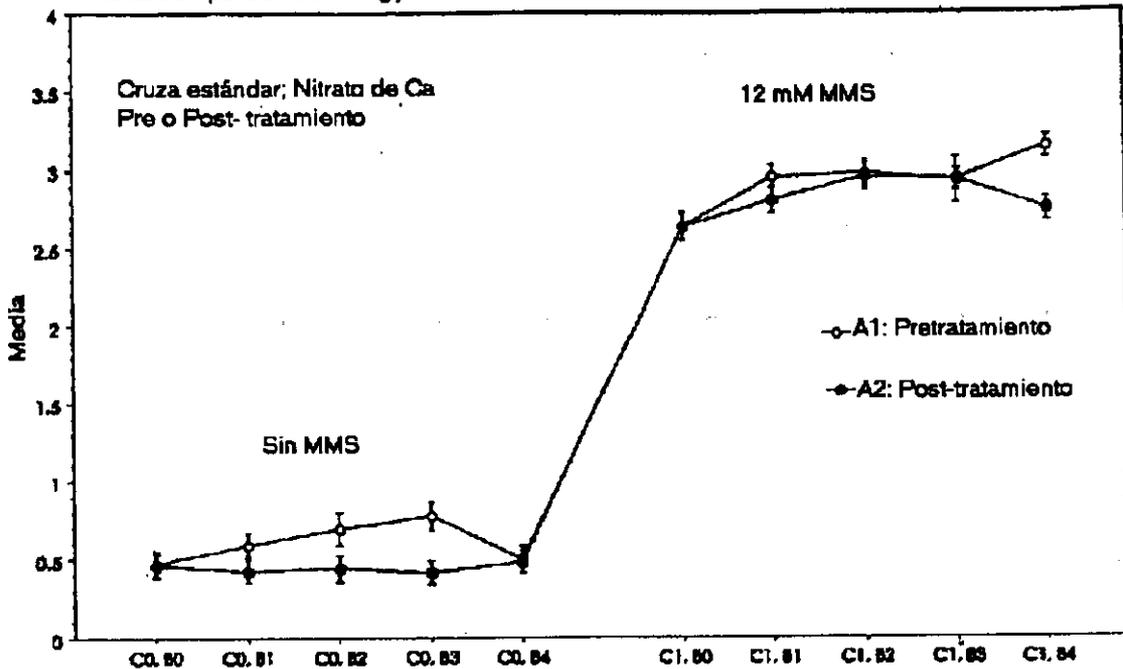


Fig. 3.11 Interacción de todos los promedios o medias aritméticas de las manchas totales/individuo (arcosenoh) en los tratamientos con nitrato de Ca, sin y con MMS. En C0 (B1, B2 y B3) así como en C1 (B4) los valores son mayores en los pretratamientos (A1) que en los post-tratamientos (A2).

EFFECTO: (C) MMS * (A) TRATAMIENTO * (B) Ca * (D) SEXO
 Interacción para arcosenoh(y) Barras: ± 1 error estándar

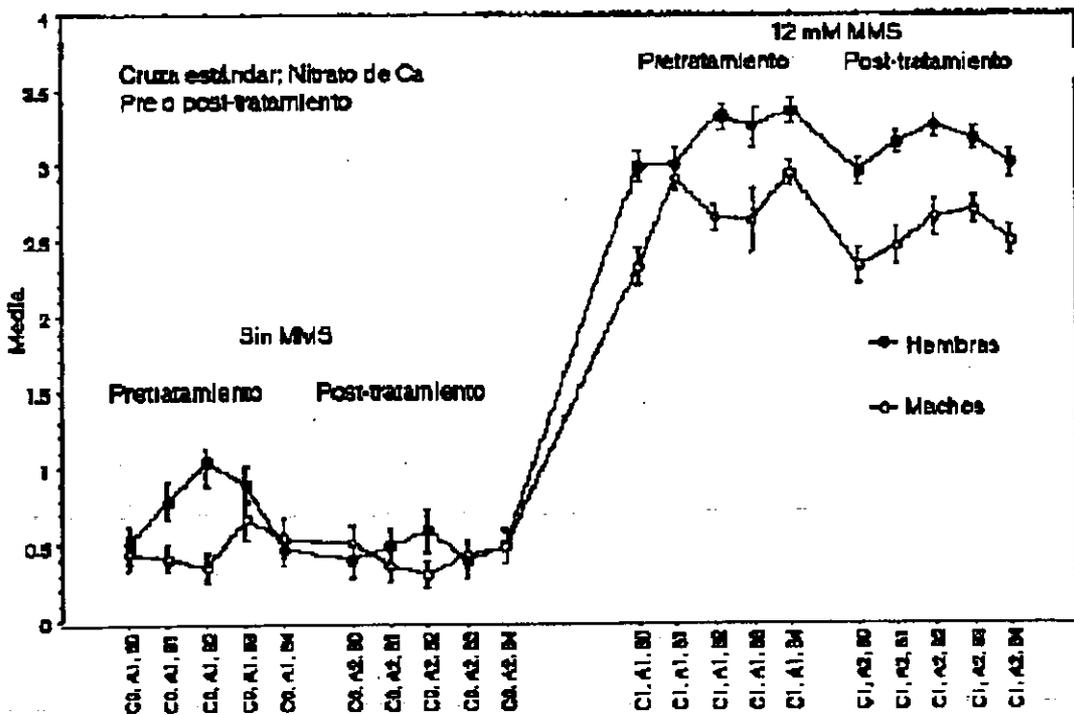


Fig. 3.12. Interacción de todos los promedios o medias aritméticas de las manchas totales/individuo (arcosenoh) en los tratamientos con nitrato de Ca, sin y con MMS. En los pretratamientos (A1) y en las hembras (F) los valores son mayores que en los post-tratamientos (A2) y en los machos (M).

3.3.2. Análisis estadístico de cada uno de los tratamientos con nitrato de Ca

El análisis de los resultados globales con ANOVA factorial indicó que el Ca no tenía efecto genotóxico en las series sin MMS o efecto modulador sobre los daños genotóxicos que provoca el MMS. Pero las significancias en los Tratamientos y el Sexo, hicieron suponer que existían datos que requerían ser analizados de manera independiente. Por lo anterior se hizo el análisis estadístico con pruebas paramétricas y no paramétricas en cada uno de los grupos de series. Los resultados de estos análisis se muestran a continuación y se representan en las Figs. 3.15 a 3.30 (APÉNDICE, Tablas 3.4 a 3.7).

Tratamientos sin MMS

Pretratamiento

El ANOVA mostró efecto del Sexo e interacción Ca * Sexo. El método de Bonferroni/Dunn y la U de Mann-Whitney mostraron significancia en el factor Sexo (APÉNDICE, Tabla 3.4).

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuos

No se encontraron diferencias significativas en el efecto Ca sobre la frecuencia de manchas totales/individuo en los testigos agua (B1) 0 mM y las concentraciones de nitrato de Ca (Fig.3.15). La distribución fue mayor en (B2) 0.1 mM (Fig.3.16).

Frecuencia y distribución de manchas totales/sexo/individuo

La interacción Ca * Sexo mostró mayor número de manchas en las hembras de (B1) 0 mM y (B2) 0.1 mM (Fig.3.17). La distribución fue mayor en hembras de (B2) 0.1 mM. (Fig. 3.18).

Post-tratamiento

Ninguna de las pruebas estadísticas mostró efecto de los factores, ni interacciones entre ellos (APÉNDICE, Tabla 3.5).

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuos

El efecto Ca no mostró diferencias entre las frecuencias de los testigos y los tratamientos (Fig.3.19). Hay distribución mayor en (B2) 0.1 mM (Fig.3.20).

Frecuencia y distribución de manchas totales/sexo/individuo

La interacción Ca * Sexo no generó diferencias significativas, excepto en (B2) 0.1 mM donde las hembras tienen más manchas (Fig. 3.21). Esto se hace claro cuando se observa la distribución mayor de manchas en hembras (B2) 0.1 mM (Fig. 3.22).

Tratamientos con MMS

Pretratamiento

El pretratamiento con MMS mostró efecto de los factores: Ca y Sexo, e interacción Ca * Sexo. El método de Bonferroni/Dunn para ANOVA mostró efecto Ca y Sexo. La prueba de H mostró efecto Ca y la prueba de U mostró efecto Sexo (APÉNDICE, Tabla 3.6).

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuos

La interacción del efecto Ca se observa en las manchas totales/individuo menores en el testigo (B0) 0mM c/mm con respecto a los otros tratamientos (Fig. 3.23). La distribución coloca las medianas por encima de 5, con mayor amplitud en (B4) 1mM (Fig. 3.24).

Frecuencia y distribución de manchas totales/sexo/individuo

La interacción Ca * Sexo mostró diferencias entre hembras y machos, excepto en (B1) 0 mM (Fig. 3.25). En todos los tratamientos las medianas de las hembras están por arriba de las de los machos, con mayor distribución en las hembras de (B4) 1 mM (Fig. 3.26).

Post-tratamiento

Con los estadísticos se determinó que hay significancia de los factores Calcio y Sexo. No hay interacción Ca * Sexo (APÉNDICE, Tabla 3.7).

Frecuencia y distribución del total de manchas en los individuos

Se encontraron diferencias significativas entre el testigo (B0) 0 mM c/mm y (B2) 0.1 mM ó (B3) 0.5 mM (Fig. 3.27). La distribución de las manchas totales coloca a la mediana de (B2) 0.1 mM por arriba de las demás (Fig. 3.28).

Frecuencia y distribución del total de manchas por sexo / individuo

La interacción Ca * Sexo causó mayor número de manchas en todas las hembras (Fig. 3.29). Las medianas de las hembras están por arriba de las de los machos y la distribución mayor fue en (B2) 0.1 mM (Fig. 3.30).

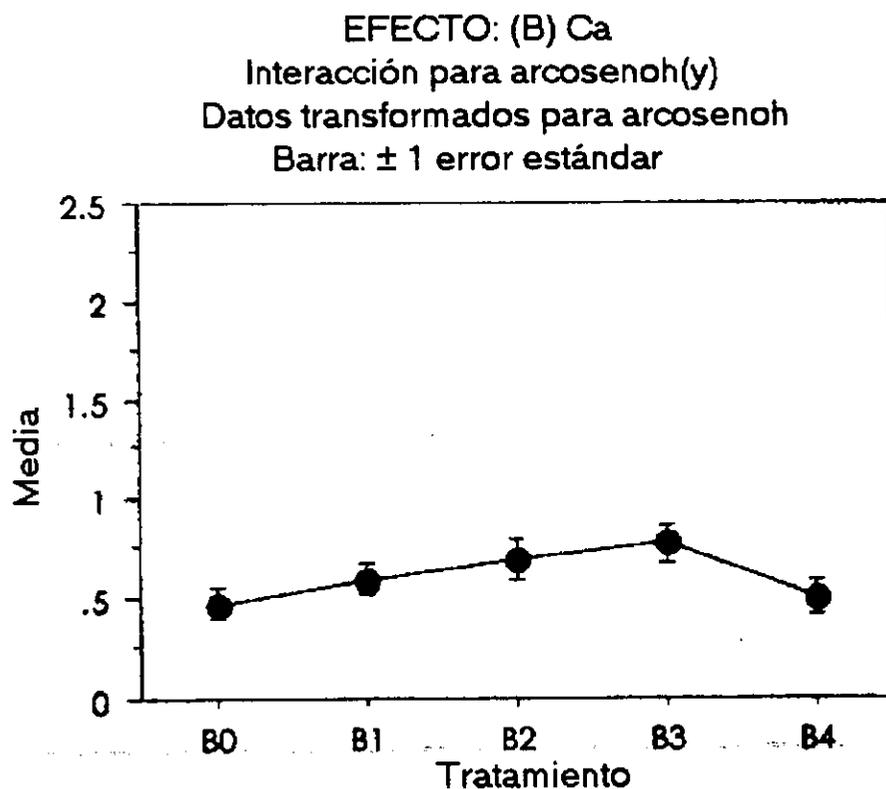


Fig. 3.15. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los pretratamientos (A1) con nitrato de calcio, sin MMS (C0). No se detectaron diferencias significativas entre éstos.

PRETRATAMIENTO CON NITRATO DE Ca, SIN MMS
 FACTOR: (B) Ca

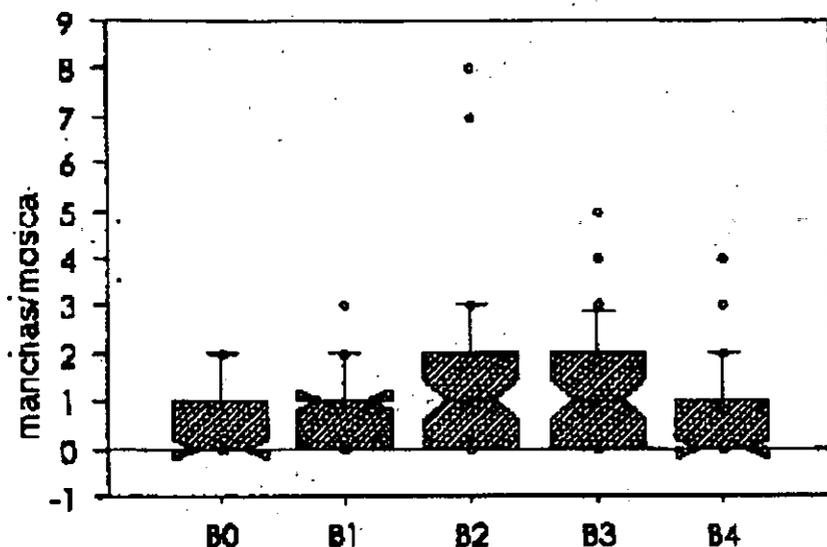


Fig. 3.16. Distribución de los individuos con manchas totales, que se obtuvieron con los pretratamientos (A1) con nitrato de Ca, sin MMS (C0). Ésta es mayor en (B2) 0.1 mM y (B3) 0.5 mM.

EFFECTO: (B) Ca * (D) SEXO

Manchas / mosca (datos transformados en arcosenoh)

Interacción para arcosenoh(y)

Barras: ± 1 error estándar

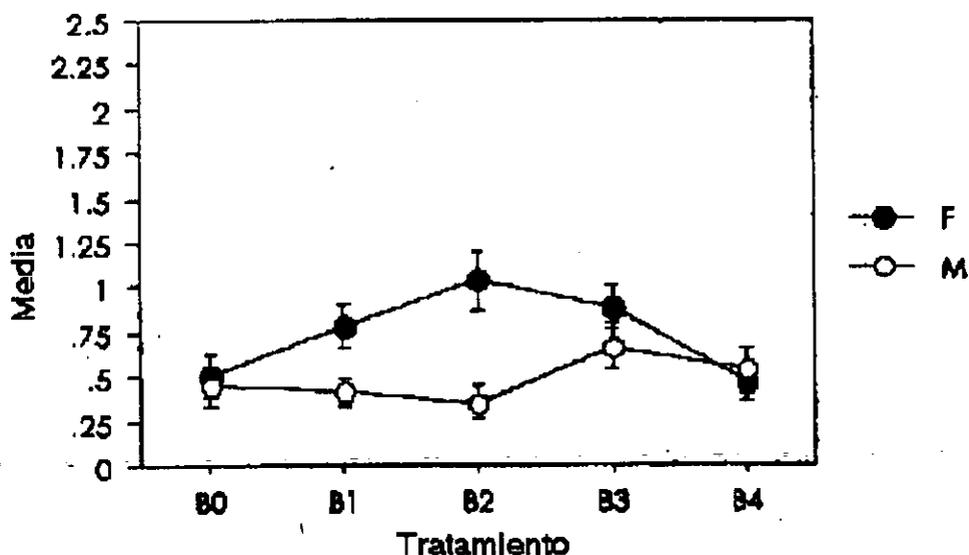


Fig. 3.17. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los pretratamientos (A1) con nitrato de calcio, sin MMS (C0). En (B1) 0 mM y (B2) 0.1 mM el valor de las hembras (F) es mayor al de los machos (M).

PRETRATAMIENTO CON NITRATO DE Ca. SIN MMS
FACTORES : (B) Ca, (D) SEXO

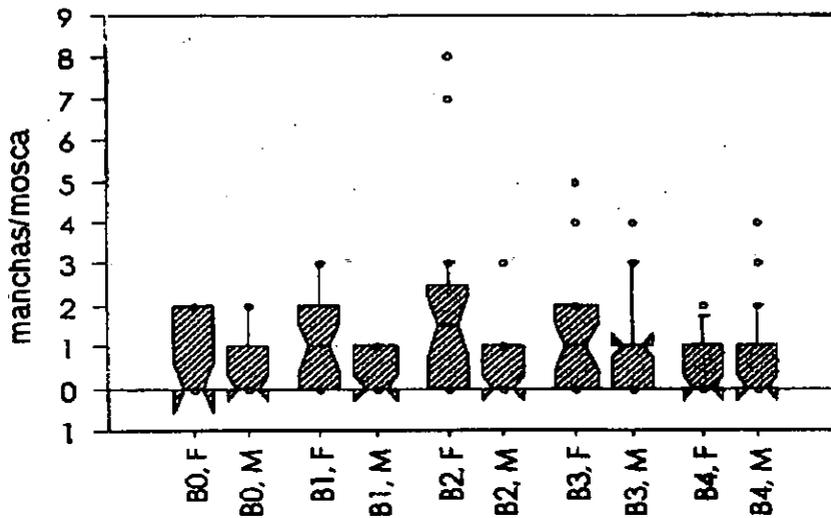


Fig. 3.18. Distribución de los individuos con manchas totales, de los pretratamientos (A1) con nitrato de Ca, sin MMS (C0). La distribución y las medianas en las hembras (F) de (B1) 0 mM, (B2) 0.1 mM y (B3) 0.5 mM son superiores a las de los machos (M).

EFEECTO: (B) Ca

Manchas / mosca (datos transformados en arcosenoh)

Interacción para arcosenoh(y)

Barras: ± 1 error estándar

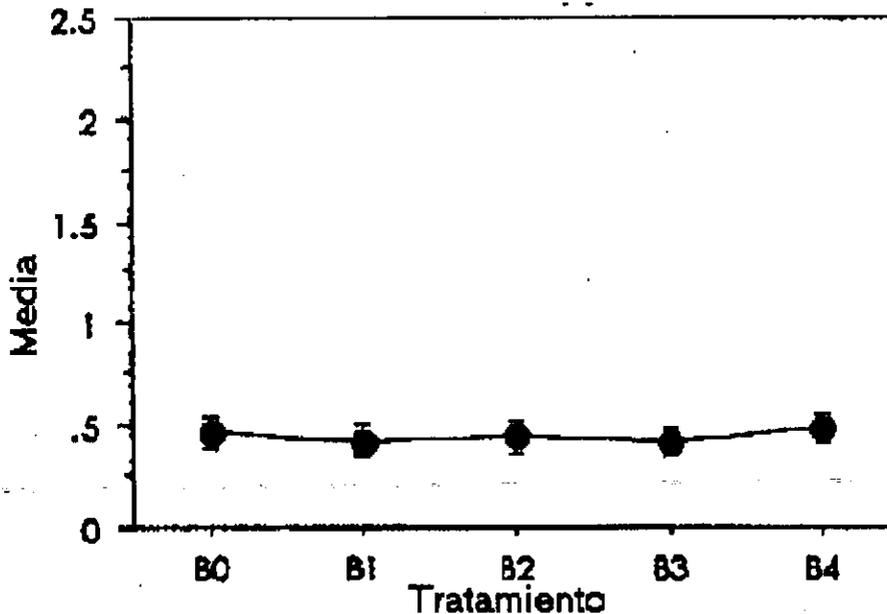


Fig. 3.19. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio, sin MMS (C0). No hay diferencias entre los valores.

I POST-TRATAMIENTO CON NITRATO DE Ca. SIN MMS
 FACTOR : (B) Ca

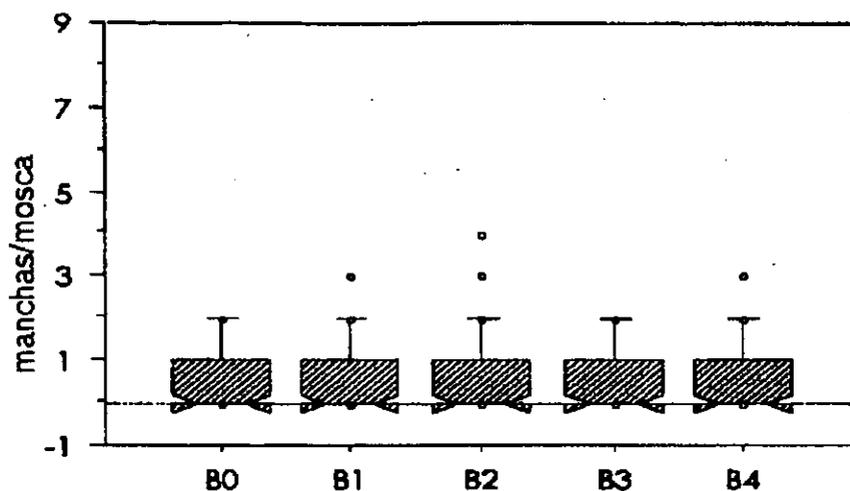


Fig. 3.20. Distribución de los individuos con manchas totales en los post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio, sin MMS (C0). No hay diferencias entre los tratamientos.

EFECTO: (B) Ca * (D)

Manchas / mosca (datos transformados en arcosenoh)

Interacción para arcosenoh(y)

Barras: ± 1 error estándar

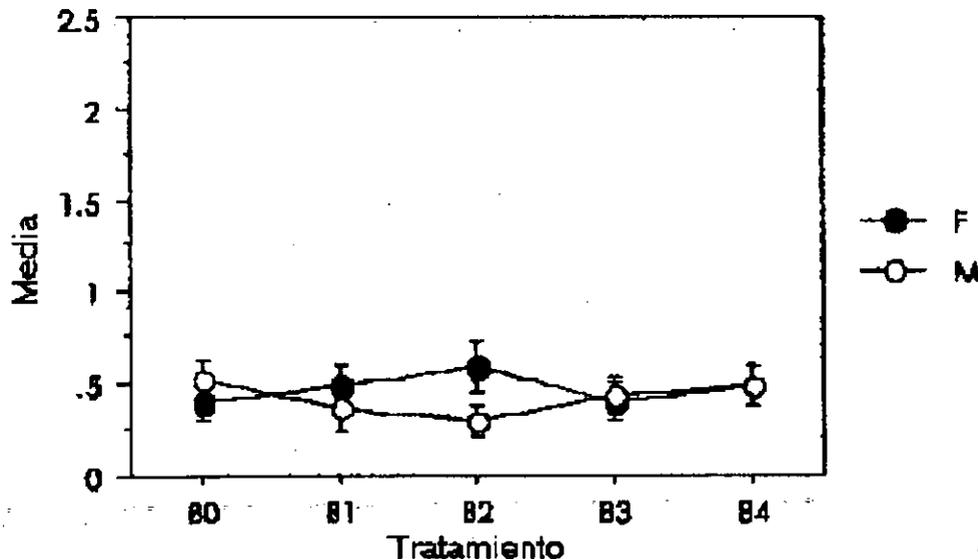


Fig. 3.21. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuos (arcosenoh) en los post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio, sin MMS (C0). Sólo en (B2) 0.1 mM el valor es superior en las hembras (F) que en los machos (M).

POST-TRATAMIENTO CON NITRATO DE Ca. SIN MMS
FACTORES : (B) Ca. (D) SEXO

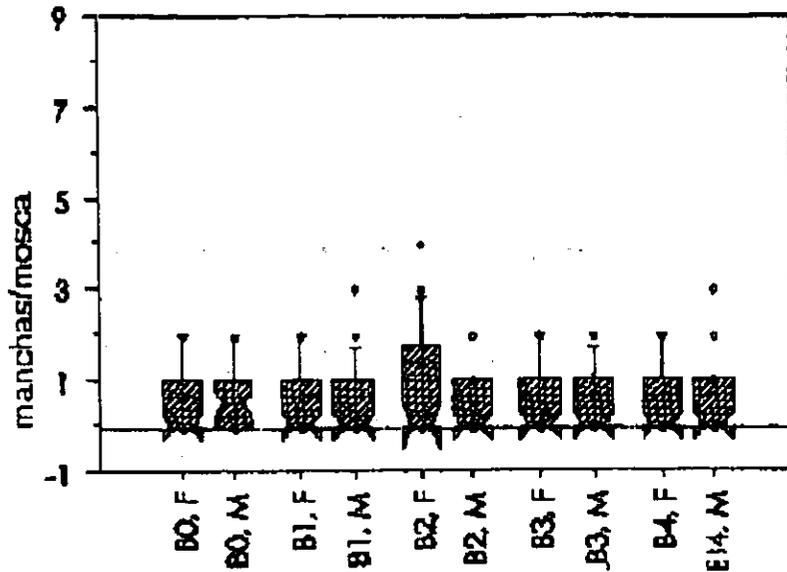


Fig. 3.22. Distribución de los individuos con manchas totales en los post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio, sin MMS (C0). No hay diferencias entre las hembras (F) y los machos (M).

EFEECTO: (B) Ca
Interacción para arcosenoh(y)
Barras: ± 1 error estándar

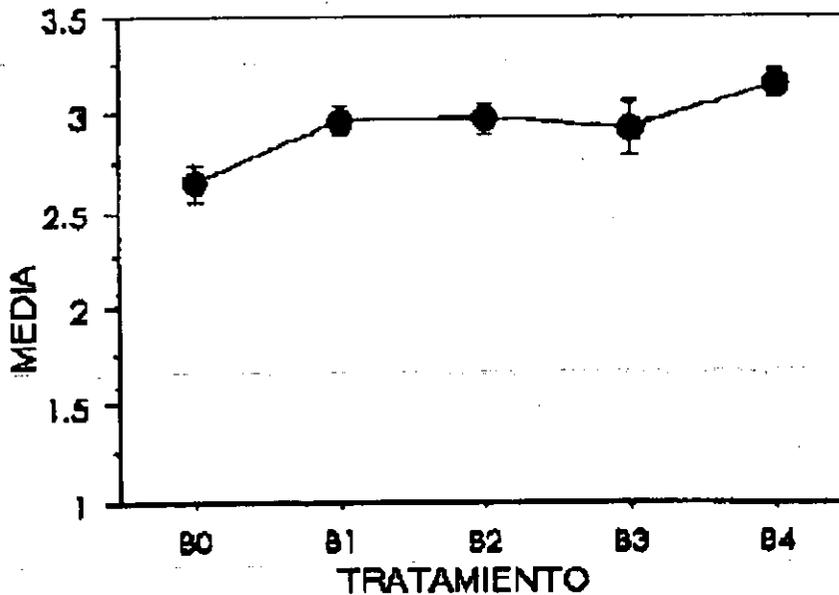


Fig. 3.23. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los pretratamientos (A1) con nitrato de Ca y MMS (C1). En (B0) 0 mM c/mm el valor es significativamente menor que en (B1) 0 mM, (B2) 0.1 mM y (B4) 1 mM.

PRETRATAMIENTO NITRATO Ca y MMS 12mM
FACTOR : (B) Ca

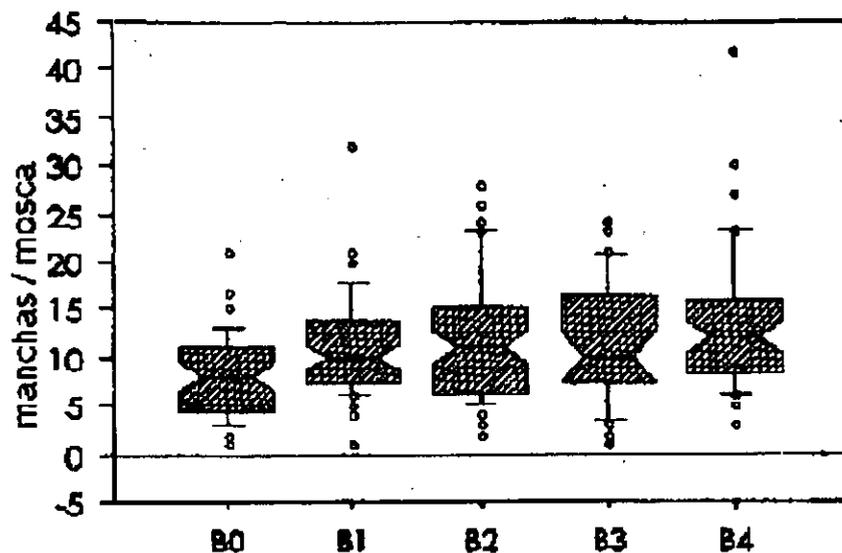


Fig. 3.24. Distribución de los individuos con manchas totales en los pretratamientos (A1) con nitrato de calcio y MMS (C1). Ésta es mayor en (B1) 0 mM y (B4) 1 mM que en los demás tratamientos.

EFFECTO: (B) Ca * (F,M) SEXO
Manchas / ala (datos transformados en arcosenoh(y)
Interacción para arcosenoh(y)
Barras: ± 1 error estándar

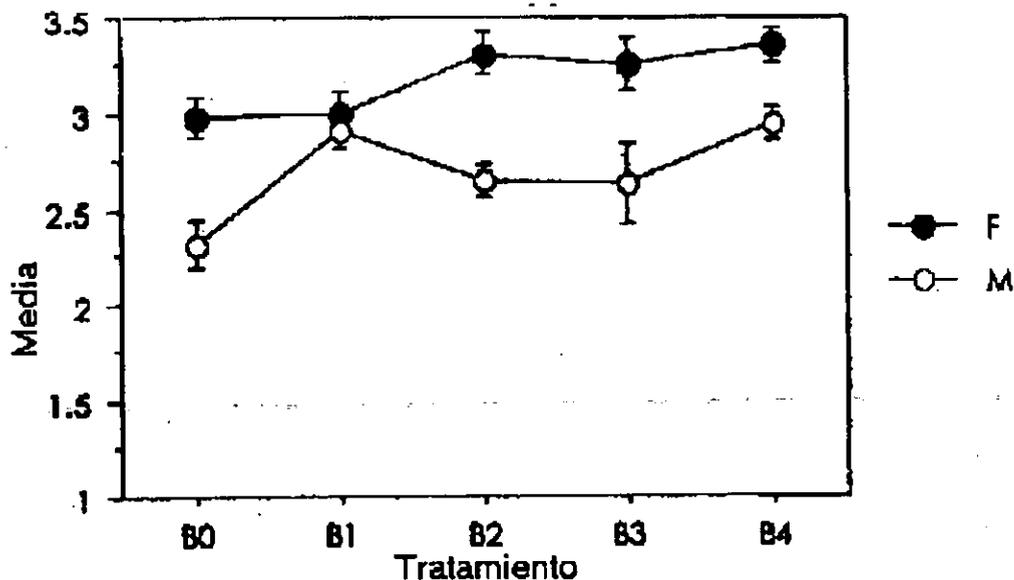


Fig. 3.25. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en pretratamiento (A1) con nitrato de Ca^{2+} y MMS (C1). En testigo (B1) 0 mM no hay diferencias, mientras que en los otros tratamientos el valor de hembras (F) es superior al de machos (M).

PRETRATAMIENTO CON NITRATO DE Ca y 12mM MMS
FACTORES: (B) Ca: (F.M) SEXO

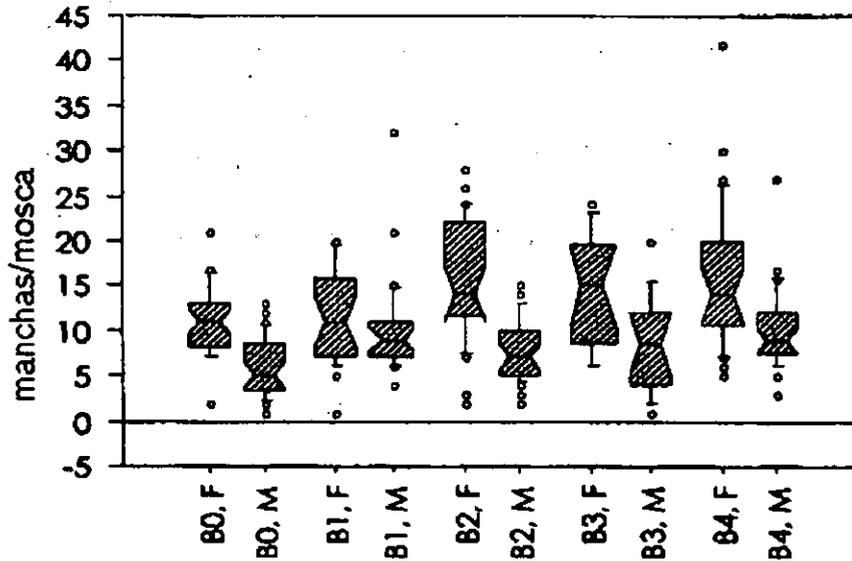


Fig 3.26. Distribución de los individuos con manchas totales en el pretratamiento (A1) con nitrato de calcio y MMS (C1). Las hembras (F) con distribución y medianas superiores que los machos (M). La distribución mayor en las hembras de (B4) 1 mM.
EFECTO: (B) Ca

Manchas / mosca (datos transformados en arcosenoh)
Interacción para arcosenoh(y)
Barras: ± 1 error estándar

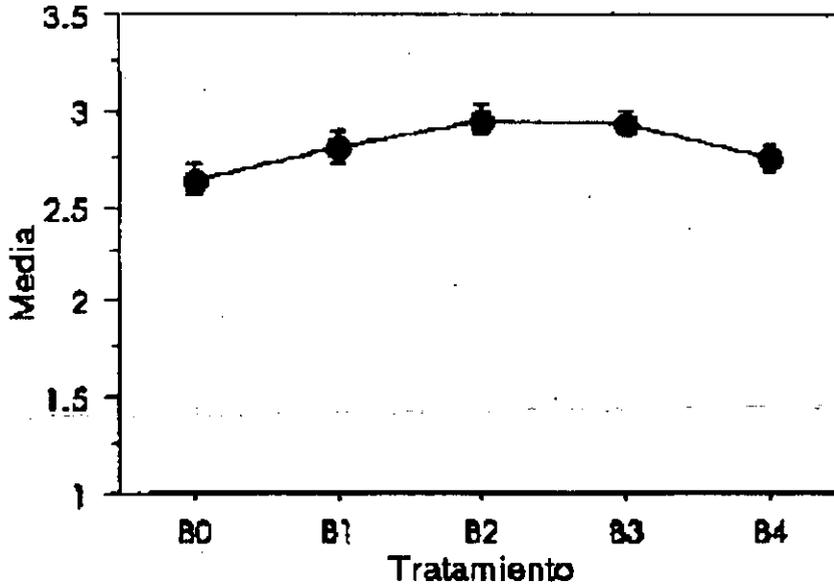


Fig. 3.27. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio y MMS (C1). En (B2) 0.1mM y (B3) 0.5mM los valores son significativamente diferentes del testigo (B0) 0 mM c/mm.

POST-TRATAMIENTO CON NITRATO DE Ca, 12 mM MMS
 FACTOR: (B) Ca

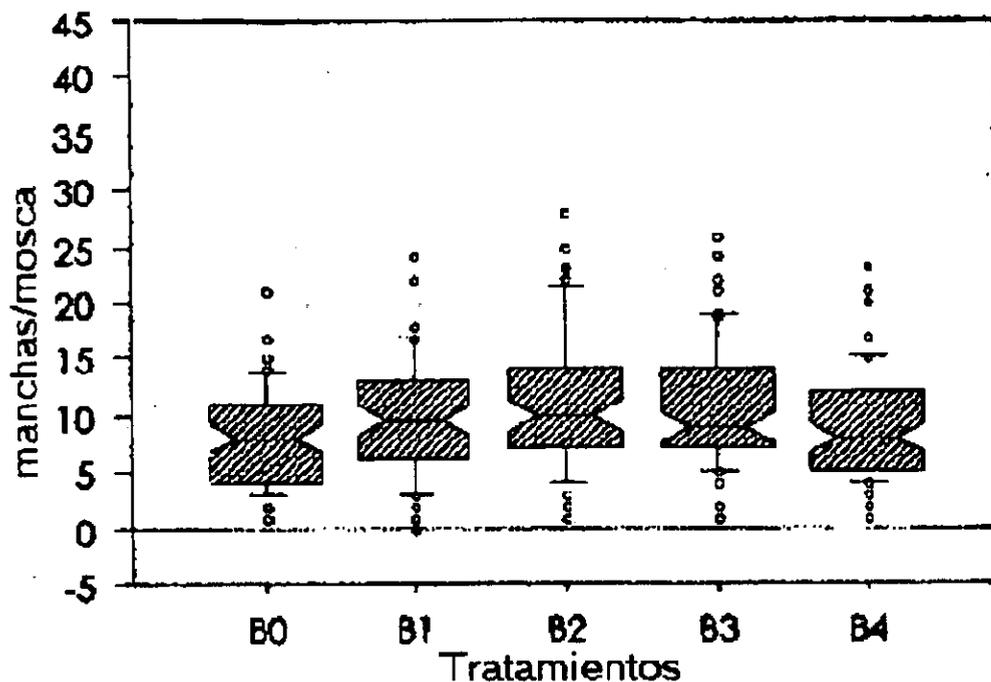


Fig. 3.28. Distribución de los individuos con manchas totales en los post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio y MMS (C1). Ésta es mayor en (B2) 0.1 mM.

EFFECTO: (B) Ca * (D) SEXO
 Manchas / mosca (datos transformados en arcosenoh)
 Interacción para arcosenoh(y)
 Barras: ± 1 error estándar

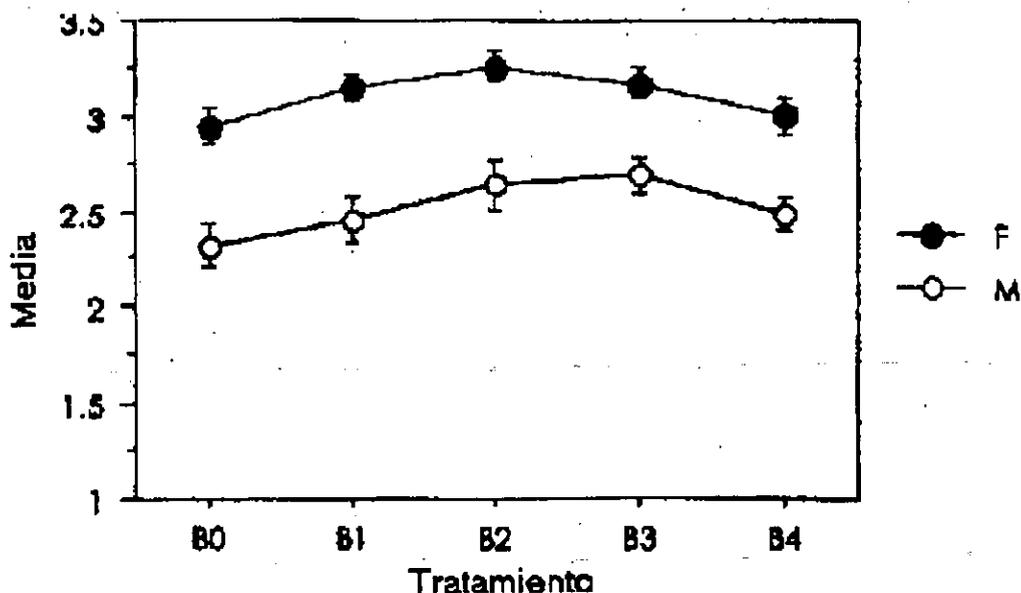


Fig3.29. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio y MMS (C1). En las hembras (F) los valores son superiores a los de machos (M).

POST-TRATAMIENTO CON NITRATO DE Ca, 12 mM MMS
 FACTORES: (B) Ca, (D) SEXO

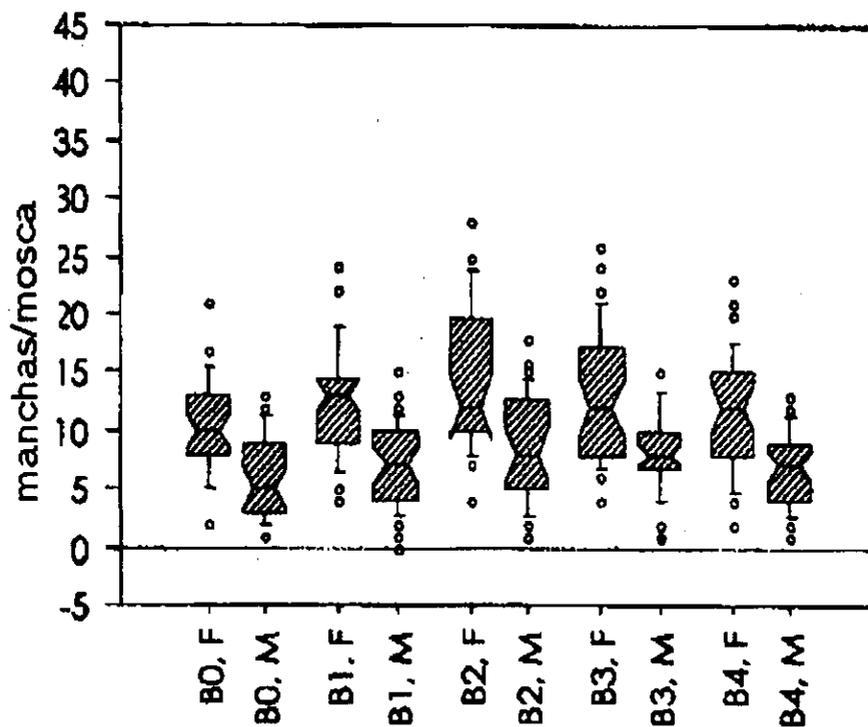


Fig. 3.30. Distribución de los individuos con manchas totales en post-tratamientos (A2) con nitrato de calcio y MMS (C1). Ésta y las medianas son mayores en las hembras (F) que en los machos (M).

3.3.3. Nitrato de plomo

El ANOVA factorial de todos los experimentos con el nitrato de plomo mostró efecto de los factores MMS, Tratamiento y Sexo, así como interacciones de primer y segundo orden (APÉNDICE, Tabla 3.8). A continuación se analizan las figuras 3.31 y 3.32 que representan esas interacciones globales detectadas con ANOVA en todas las series con nitrato de Pb.

Frecuencia de manchas totales/individuos

La interacción Pb * MMS * Tratamiento produjo mayor número de manchas en las series de los pretratamientos (A1) y en las series con MMS (C1) al contrario de las series de los post-tratamientos (A2) y sin MMS (C0) (Fig. 3.31).

Frecuencia de manchas totales/sexo/individuo

Sin MMS, sólo hay un número mayor de manchas en las hembras de (B1) 0 mM y (B2) 0.1 mM del pretratamiento (A1) y en (B2) 0.1 mM y (B3) 0.5 mM del post-tratamiento (A2). Con MMS (C1) todas las hembras mostraron mayor número de manchas excepto en (B4) 1 mM del posttratamiento (A2). En machos de (B2) 0.1 mM del pretratamiento (A1) la mediana es el valor más bajo (Fig. 3.32).

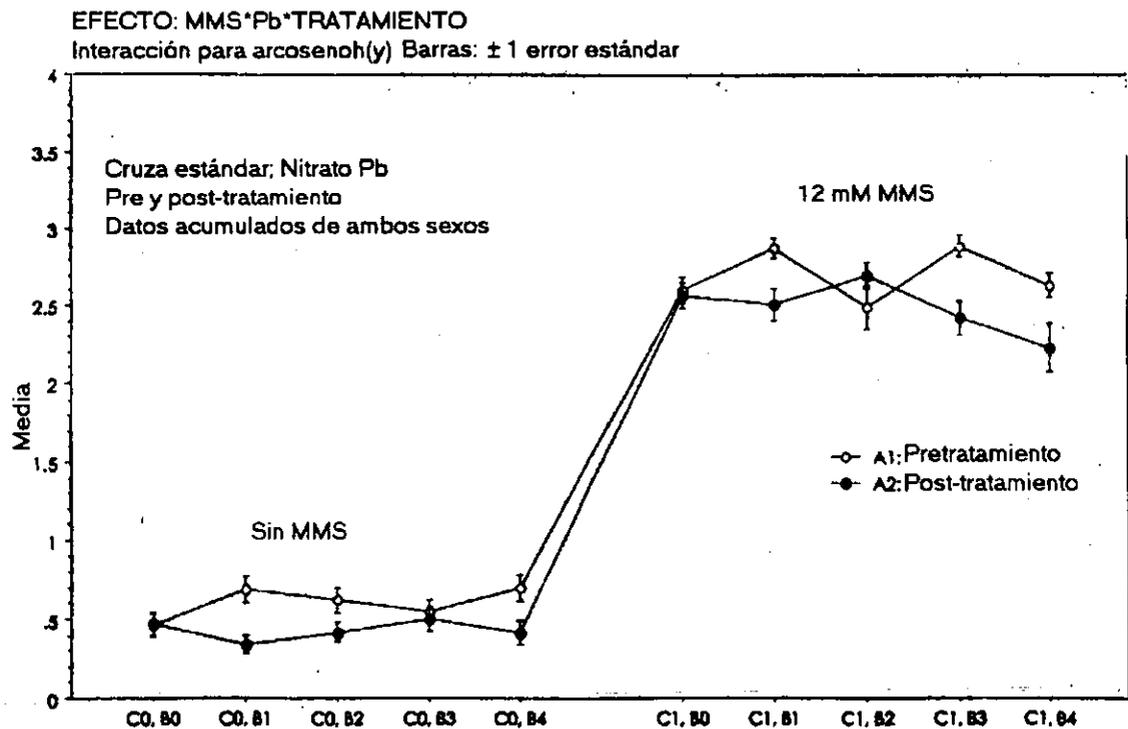


Fig. 3.31. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) para los tratamientos con nitrato de Pb, sin y con MMS. En C0 (B1, B2, B4) y C1 (B1, B3 y B4) los valores son mayores en los pretratamientos (A1) que en los post-tratamientos (A2).

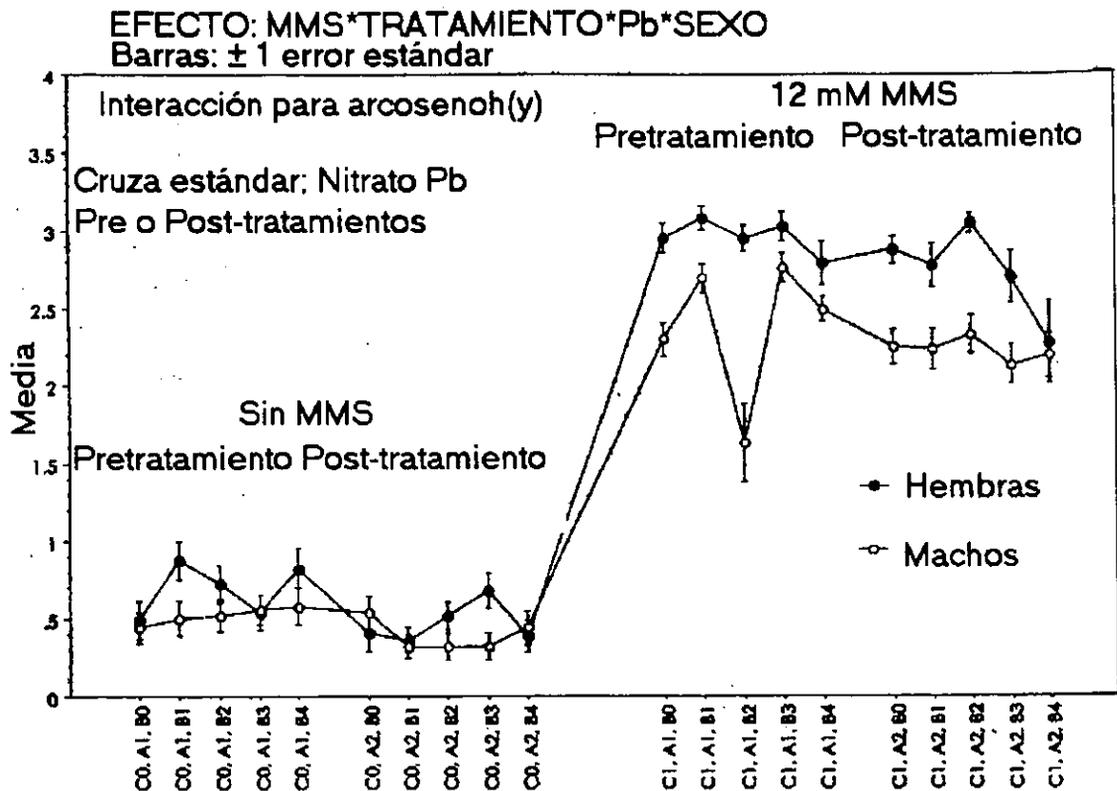


Fig. 3.32. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcsenoh) en los tratamientos con nitrato de Pb, sin (C0) y con MMS (C1). Los valores son mayores en los pretratamientos (A1) y las hembras que en los post-tratamientos (A2) y machos.

Como en el caso del nitrato de Ca se graficaron las distribuciones de los individuos con sus manchas totales para cada una de las series de tratamientos. En estas gráficas se hace evidente la asimetría en los tratamientos que fueron significativos con ANOVA, lo cual coincide con la premisa de una mayor distribución hacia la cola derecha cuando hay significancia.

Distribución del total de manchas en los individuos

En ausencia de MMS (C0) la distribución coloca a las medianas del pretratamiento (A1) en el valor 1, excepto en (B0) 0mM c/mm cuya mediana es 0. En el post-tratamiento (A2) todas las medianas tienen el valor de 0. La mayor distribución se presenta en (B4) 1 mM de los pretratamientos (A1).

Con MMS (C1) y pretratamiento (A1) se obtuvieron medianas superiores en (B1) 0 mM y (B3) 0.5 mM. En el post-tratamiento (A2) la mediana superior ocurrió en (B2) 0.1 mM. La mediana de (B4) 1 mM fue significativamente menor que la del testigo (B0) 0 mM c/mm. (Fig. 3.33).

Distribución de manchas totales/sexo/individuo

En el pretratamiento (A1) sin MMS (C0), las medianas del testigo (B0) 0 mM c/mm de ambos sexos están en 0. En esta serie hay heterogeneidad en los valores en ambos sexos y

los valores de (B1) 0 mM y (B4) 1mM de hembras son los de más amplia distribución. En el postratamiento (A2) sin MMS (C0) la mayoría tiene su mediana en el valor 0.

Con MMS (C1), el pretratamiento (A1) ubica a las medianas de las hembras por arriba de las de los machos y con una mayor distribución en hembras de (B4) 1 mM. El post-tratamiento (A2) con MMS (C1) también presenta las medianas de hembras por arriba de los machos, con mayor distribución en hembras (B4) 1 mM (Fig. 3.34).

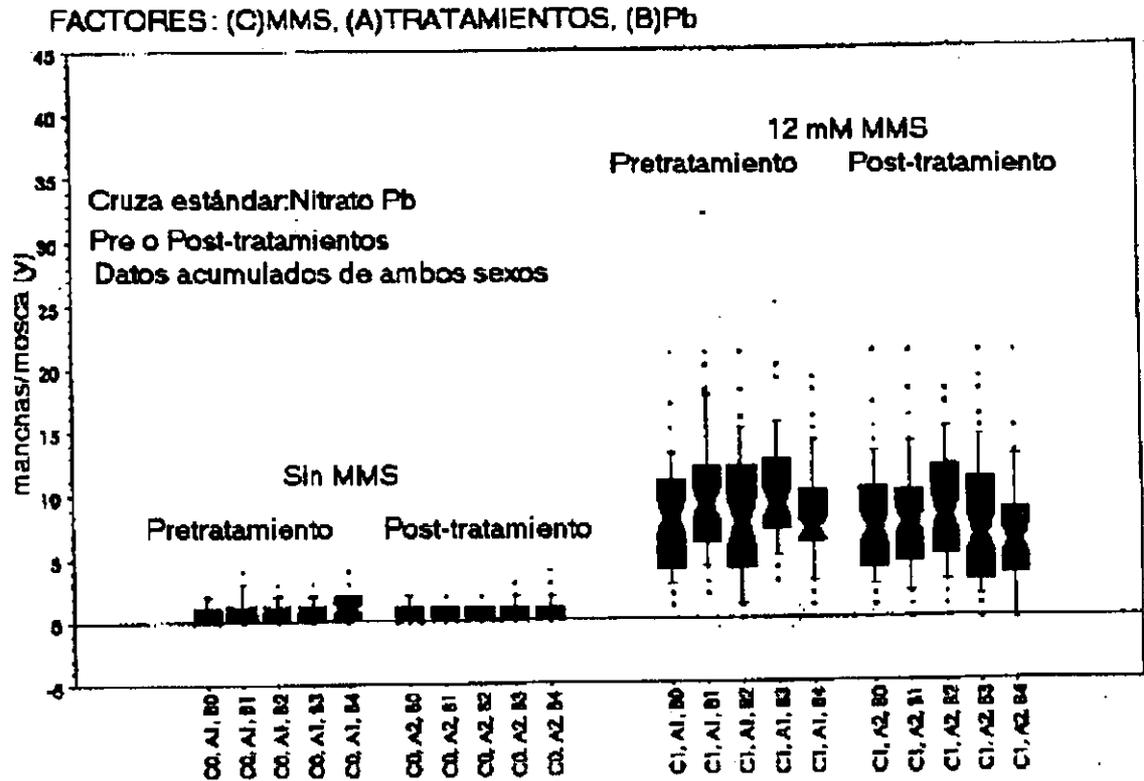


Fig. 3.33. Distribución de los individuos con manchas totales en los tratamientos con nitrato de Pb, sin (C0) y con MMS (C1). Ésta y las medianas son mayores en los pretratamientos (A1) que en los post-tratamientos (A2).

FACTORES: (C)MMS. (A)TRATAMIENTO. (D) SEXO. (B)Pb

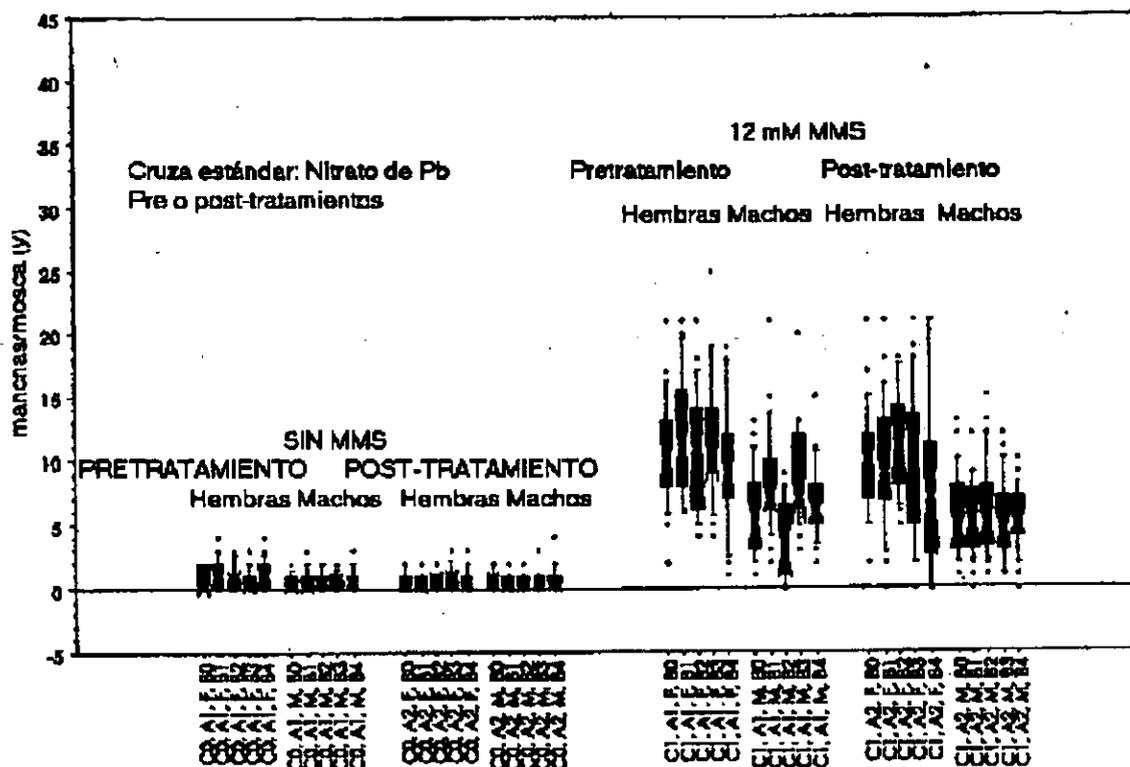


Fig. 3.34. Distribución de los individuos con manchas totales en los tratamientos con nitrato de Pb, sin (C0) y con MMS (C1). Los valores de las medianas y la distribución son mayores en los pretratamientos (A1) y en las hembras (F) que en los postratamientos (A2) y los machos (M).

3.3.4. Análisis estadístico individual de los tratamientos con nitrato de Pb

Las significancias indicaron que había datos que debían ser analizados de manera independiente por lo que se hizo el análisis estadístico de los grupos de series para contrastar y detectar las diferencias evidenciadas en el ANOVA global (APÉNDICE, Tabla 3.8). Los resultados se muestran a continuación (Figs. 3.35 a 3.50).

Tratamientos sin MMS

Pretratamiento

El ANOVA mostró el efecto Sexo, lo cual fue corroborado con el método de Bonferroni-Dunn y la prueba de U (APÉNDICE, Tabla 3.9). Con la prueba de H se comprobó que el factor Pb no fue significativo. El factor Sexo fue significativo porque las manchas en hembras tienden a tener mayor proporción que en los machos, pero de manera variable y no sistemática. En los machos la frecuencia fue más uniforme en los testigos (B1) 0 mM y las series con Pb^{2+} . No se encontró interacción Pb * Sexo.

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuos

No se encontraron diferencias en la frecuencia de manchas/individuo entre los testigos y las series con plomo (Fig. 3.35). La distribución coloca las medianas de las series por encima del valor 0 que tiene (B0) 0 mM c/mm y los valores más altos en (B4) 1 mM (Fig. 3.36).

Frecuencia y distribución de manchas totales/sexo/individuo

La interacción Pb * Sexo sólo mostró diferencias entre machos y hembras en el testigo (B1) 0 mM (Fig. 3.37). La distribución coloca las medianas de las hembras de (B1) 0 mM, (B2)

0.1 mM y (B4) 1 mM por arriba de las de los machos con los valores más alto en (B1) 0 mM y (B4) 1 mM (Fig. 3.38).

Post-tratamiento

De la misma manera que ocurrió con el calcio, con este tratamiento los testigos y las series con nitrato de Pb mostraron mayor uniformidad en la frecuencia de manchas en hembras y machos. No hubo significancia del factor Sexo, ni del factor Pb, ni interacciones entre los factores (APÉNDICE, Tabla 3.10).

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuos

No se encontraron diferencias, ni efecto de los factores en estos tratamientos (Fig. 3.39). La distribución coloca las medianas en el valor 0 (Fig. 3.40).

Frecuencia y distribución del total de manchas por sexo/individuo

No hubo interacción Pb * Sexo aun cuando en (B3) 0.5 mM el promedio es levemente mayor en las hembras (Fig. 3.41). La distribución no mostró diferencias consistentes entre las medianas, ni en las distribuciones de hembras y machos (Fig. 3.42).

Tratamientos con MMS

Pretratamiento

Con el ANOVA se encontró el efecto de los factores Pb y Sexo, el método de Bonferroni-Dunn y la prueba de U mostraron también el efecto del factor Sexo (APÉNDICE, Tabla 3.11). El factor Sexo fue muy significativo porque las hembras tienen más manchas que los machos. El factor Pb fue también muy significativo porque el promedio de (B2) 0.1 mM fue inferior al del testigo (B1) 0 mM y a (B3) 0.5 mM. La interacción Pb * Sexo fue muy significativa porque el promedio en los machos de (B2) 0.1 mM fue significativo.

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuos

Se obtuvieron diferencias entre los promedios de (B1) 0 mM y (B2) 0.1 mM, así como entre (B2) 0.1 mM y (B3) 0.5 mM (Fig. 3.43). La distribución presenta las medianas de (B1) 0 mM y (B3) 0.5 mM por arriba de (B4) 1 mM (Fig. 3.44).

Frecuencia y distribución de manchas totales/sexo/individuo

Los promedios de las hembras fueron superiores a las de los machos (Fig. 3.45). La distribución coloca las medianas de las hembras y con extensión mayor. En los machos hay una heterogeneidad en la respuesta, representada por (B2) 0.1 mM en donde hay muy pocas manchas en los machos y por (B1) 0 mM donde un macho tuvo más de 30 manchas (Fig. 3.46).

Post-tratamiento

Con ANOVA se mostró efecto de los factores Pb y Sexo. El método de Bonferroni-Dunn y la prueba de U corroboraron el efecto Sexo. El factor Sexo fue altamente significativo porque en las hembras hay más manchas que en los machos. El efecto Pb fue corroborado por el método de Bonferroni-Dunn, sin embargo con la prueba de H no fue significativo (Tabla 3.12). La significancia de Pb en ANOVA y Bonferroni-Dunn se debe a un número muy bajo de manchas en (B2) 0.1 mM y muy alto en (B4) 1 mM, variación no sistemática cuyo origen no es claro. La interacción Sexo * Pb no fue significativa, aún cuando la variación individual en las hembras de (B4) 1 mM fue muy alta, de 0 a 20 manchas, dado

que ese rango también se observó en los testigos (B0) 0 mM c/mm y (B1) 0 mM con MMS, pero sin nitrato de Pb.

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuo

En la interacción de los promedios, (B0) 0 mM c/mm y (B2) 0.1 mM son diferentes de (B4) 1 mM (Fig. 3.47). La distribución coloca la mediana de (B4) 1 mM por debajo de las otras series (Fig. 3.48).

Frecuencia y distribución de manchas totales/sexo/individuo

La interacción Pb * Sexo mostró mayor número de manchas en las hembras excepto en (B4) 1 mM (Fig.3.49). La distribución es mayor en las hembras y coloca las medianas por arriba de las de los machos (Fig.3.50).

EFEECTO: (B) Pb
Interacción para $\arcsenoh(y)$
Barras: ± 1 error estándar

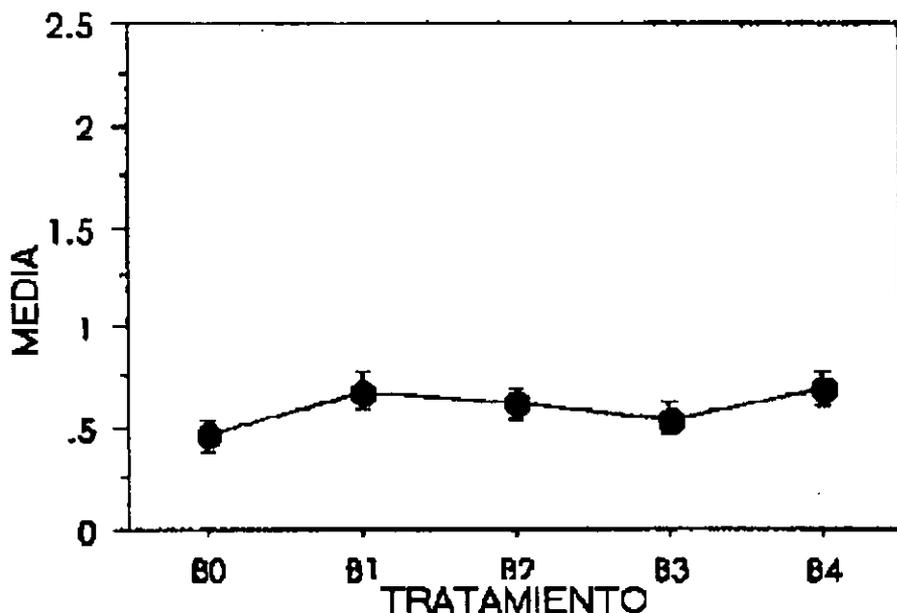


Fig. 3.35. Interacción de los promedios o medias aritméticas del total de manchas/individuo (\arcsenoh) en el pretratamiento (A1) con nitrato de Pb, sin MMS (C0). En (B1) 0 mM y (B4) 1 mM los valores son superiores que en el testigo (B0) 0 mM c/mm.

PRETRATAMIENTO CON NITRATO DE Pb, SIN MMS
 FACTOR : (B) Pb

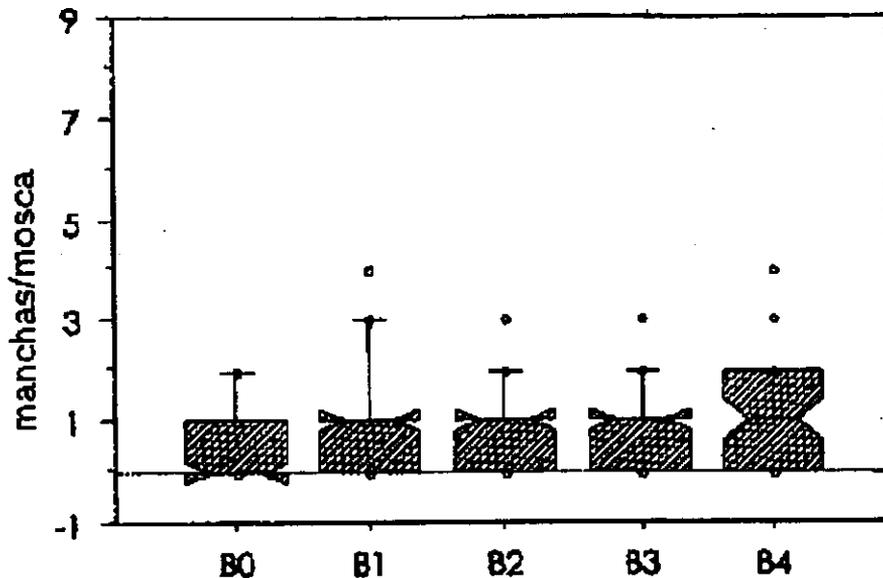


Fig.3.36. Distribución de los individuos con manchas totales del pretratamiento (A1) con nitrato de Pb, sin MMS (C0). Ésta es menor en (B0) 0 mM c/mm.

EFFECTO: Pb * SEXO
 Interacción para arcosenoh(y)
 Barras: ± 1 error estándar

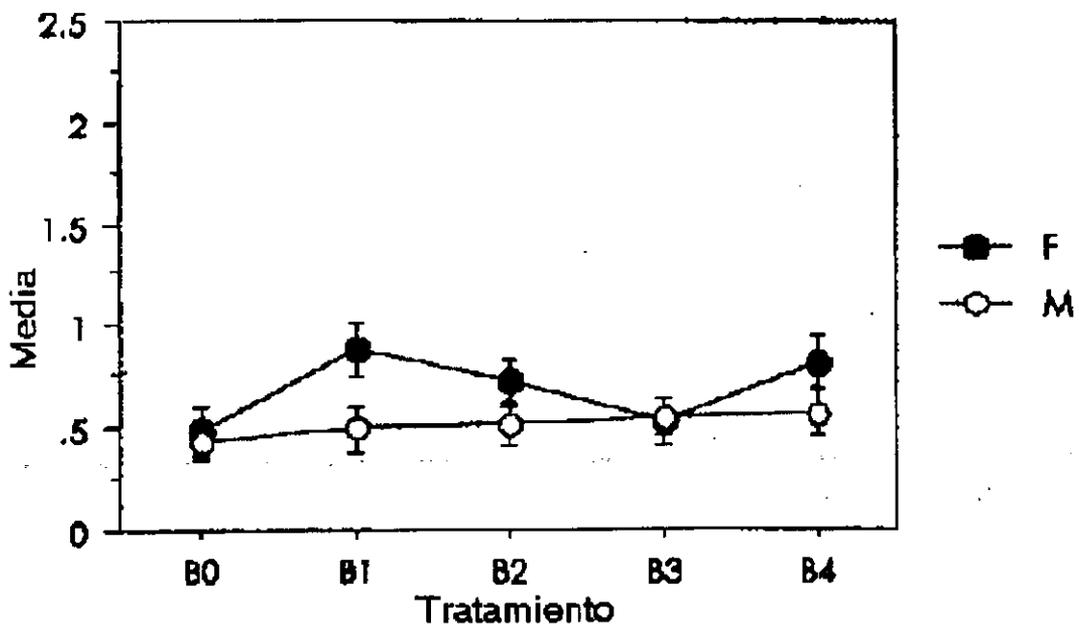


Fig. 3.37. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los pretratamientos (A1) con nitrato de Pb, sin MMS (C0). Sólo en las hembras (F) de (B1) 0 mM hay mayor número de manchas que en los machos (M).

PRETRATAMIENTO CON NITRATO DE Pb. SIN MMS
FACTORES: (B) Pb. (D) SEXO

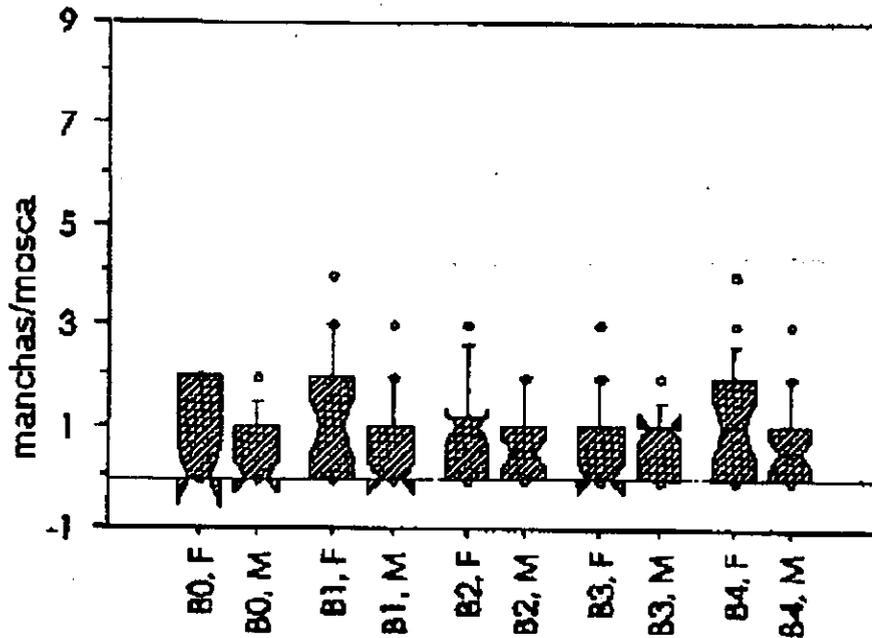


Fig. 3.38. Distribución de los individuos con manchas totales en el pretratamiento (A1) con nitrato de Pb, sin MMS (C0). En las hembras (F) de (B1) 0 mM, y (B4) 1 mM ésta es mayor que en los machos (M).

EFFECTO: (B) Pb

Manchas / ala (datos transformados en arcosenoh)

Interacción para arcosenoh(y)

Barras: ± 1 error estándar

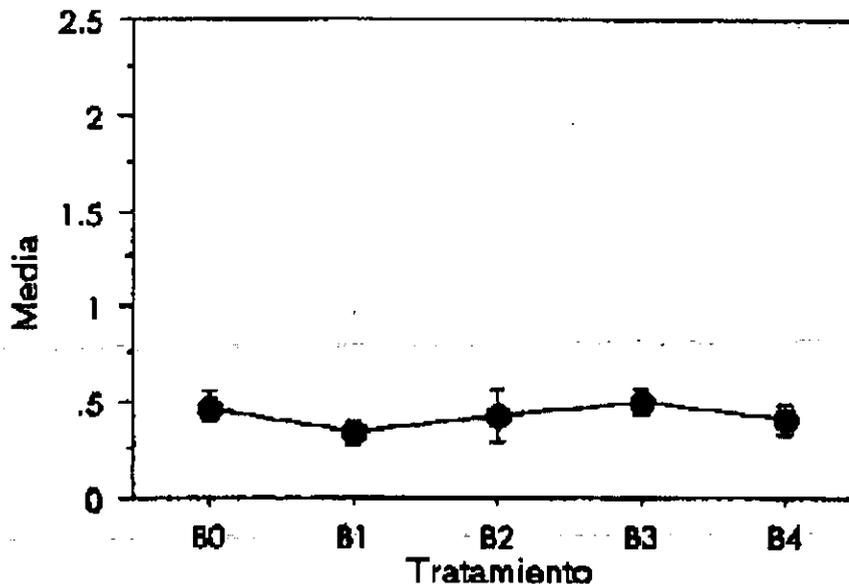


Fig. 3.39. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los post-tratamientos (A2) con nitrato de Pb, sin MMS (C0). No existen diferencias entre los tratamientos.

POST-TRATAMIENTO CON NITRATO DE Pb, SIN MMS
 FACTOR : (B) Pb

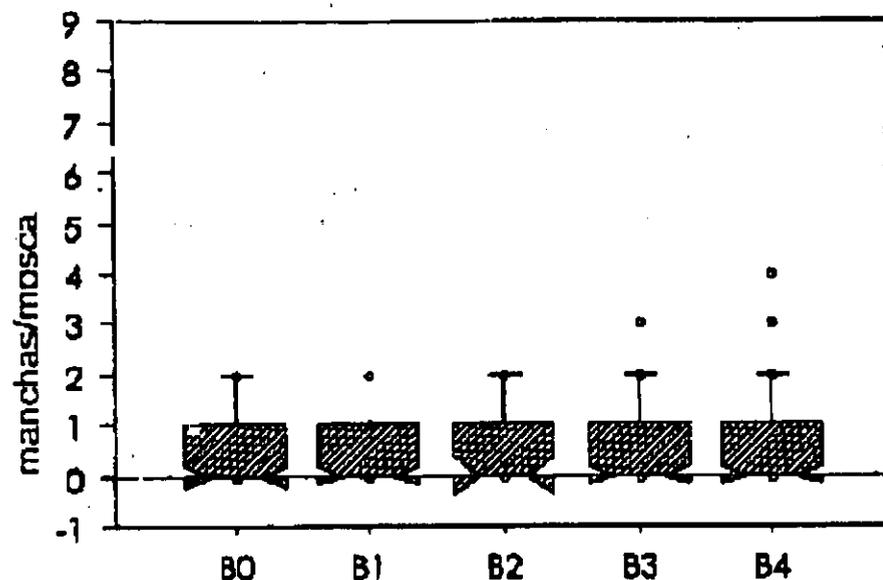


Fig. 3.40. Distribución de los individuos con manchas totales en los post-tratamientos (A2) con nitrato de Pb, sin MMS. (C0) No hay diferencias ni en la distribución, ni en las medianas.

EFFECTO: (B) Pb * (D) SEXO

Manchas / ala (datos transformados en arcosenoh)

Interacción para arcosenoh(y)

Barras: ± 1 error estándar

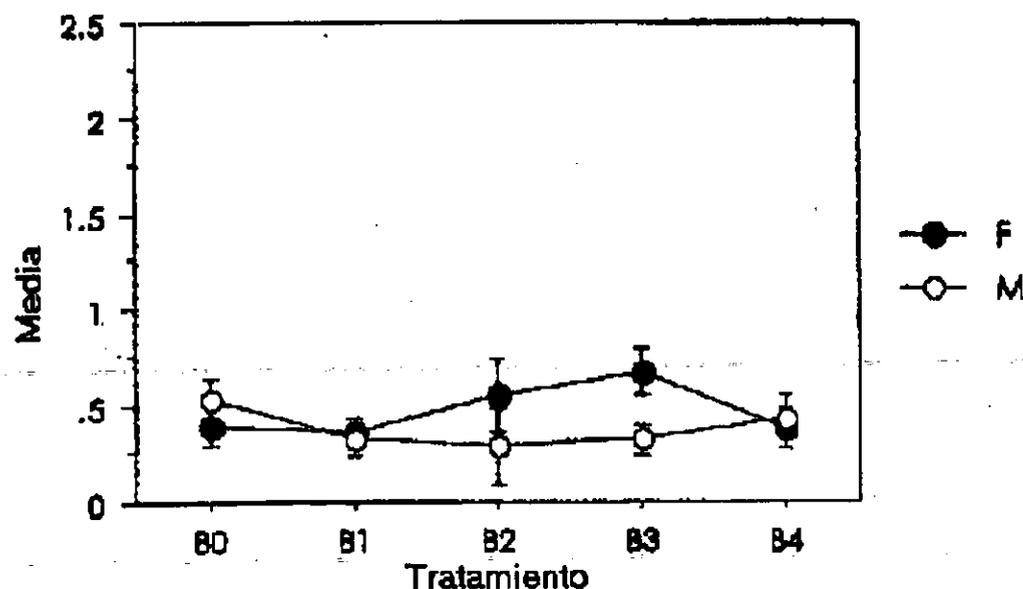


Fig. 3.41. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los post-tratamientos (A2) con nitrato de Pb, sin MMS (C0). Sólo (B3) 0.5 mM muestra valores mayores en las hembras (F) que en los machos (M).

POST-TRATAMIENTO CON NITRATO DE Pb, SIN MMS
FACTORES: (B) Pb, (D) SEXO

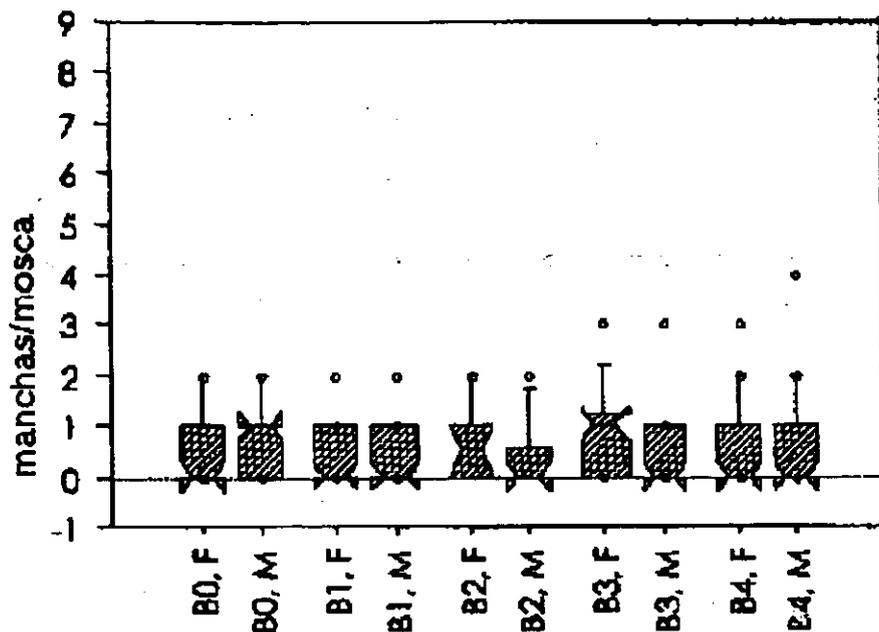


Fig. 3.42. Distribución de los individuos con manchas totales/individuo en los post-tratamientos (A2) con nitrato de Pb, sin MMS (C0). No se observan diferencias consistentes o entre las medianas de hembras (F) y machos (M).

EFFECTO: (B) Pb
Manchas / ala (datos transformados en arcosenoh)
Interacción para arcosenoh(y)
Barras: ± 1 error estándar

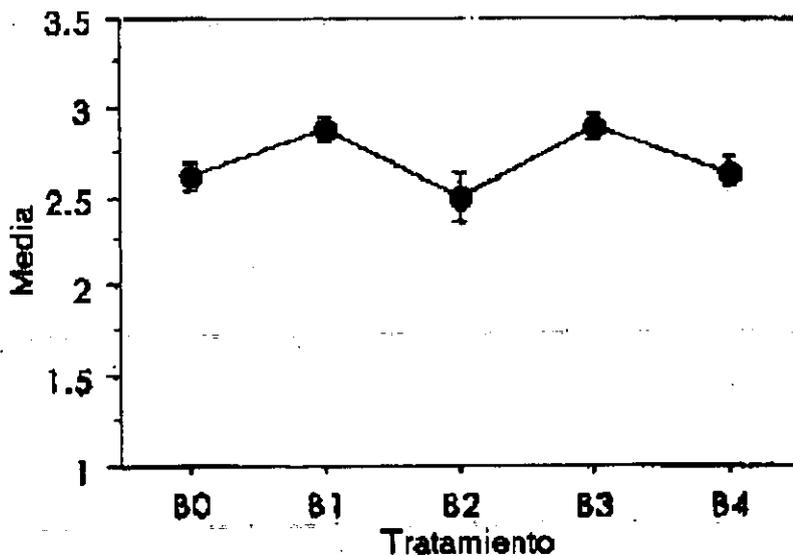


Fig. 3.43. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh). Las valores de (B1) 0 mM y (B3) 0.5 mM son mayores que los otros.

PRETRATAMIENTO CON NITRATO DE Pb y 12 mM MMS
 FACTOR : (B) Pb

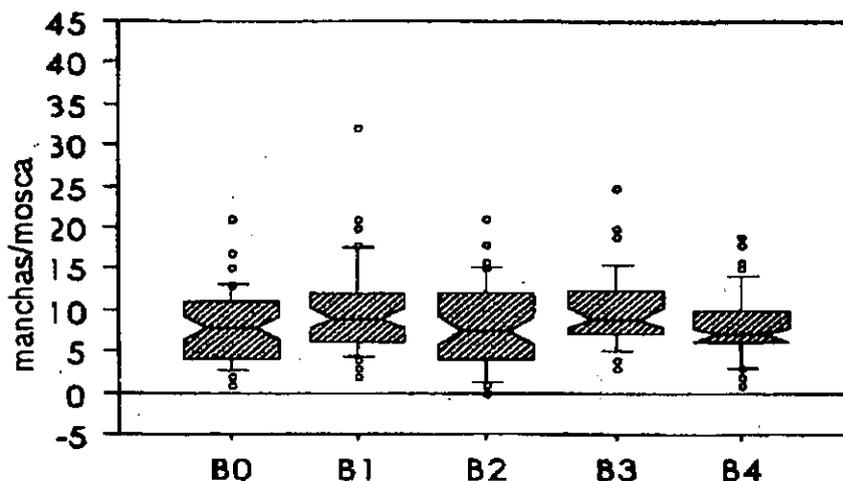


Fig. 3.44. Distribución de los individuos con manchas totales en los pretratamientos (A1) con nitrato de Pb y MMS (C1). No hay diferencias en la distribución, ni en las medianas de las series.

EFEECTO: Pb * SEXO
 Manchas / ala (datos transformados en arcosenoh)
 Interacción para arcosenoh(y)
 Barras: ± 1 error estándar

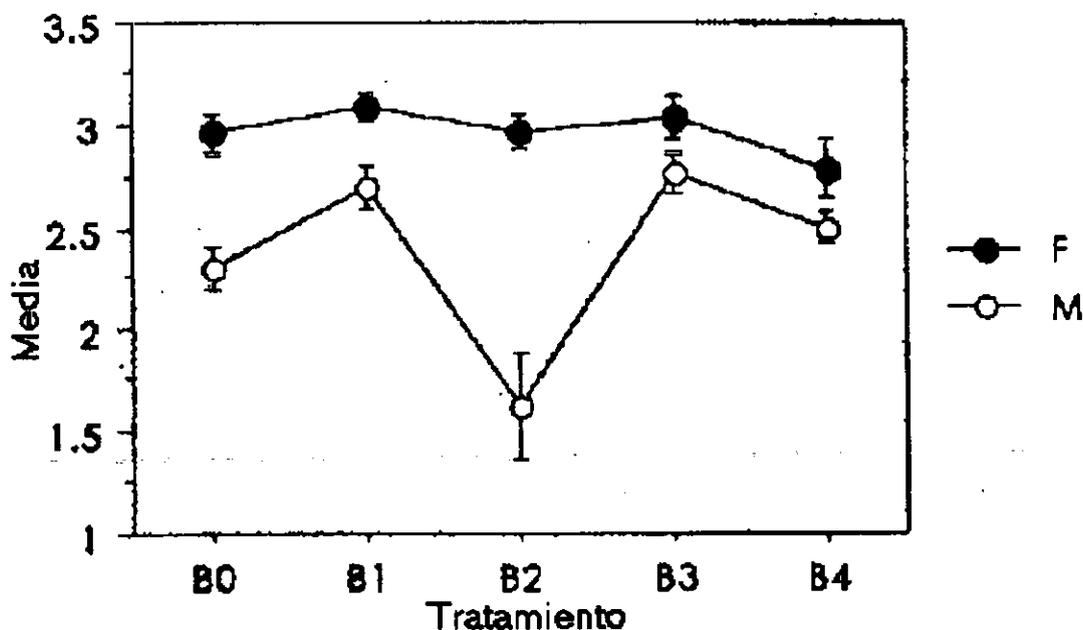


Fig. 3.45. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los pretratamientos (A1) con nitrato de Pb y MMS (C1). Los valores en hembras (F) son superiores que en machos (M). El valor de machos en B2=0.1 mM es muy bajo.

PRETRATAMIENTOS CON NITRATO DE Pb y 12 mM MMS
 VARIABLES: (B) Pb, (F,M) SEXO

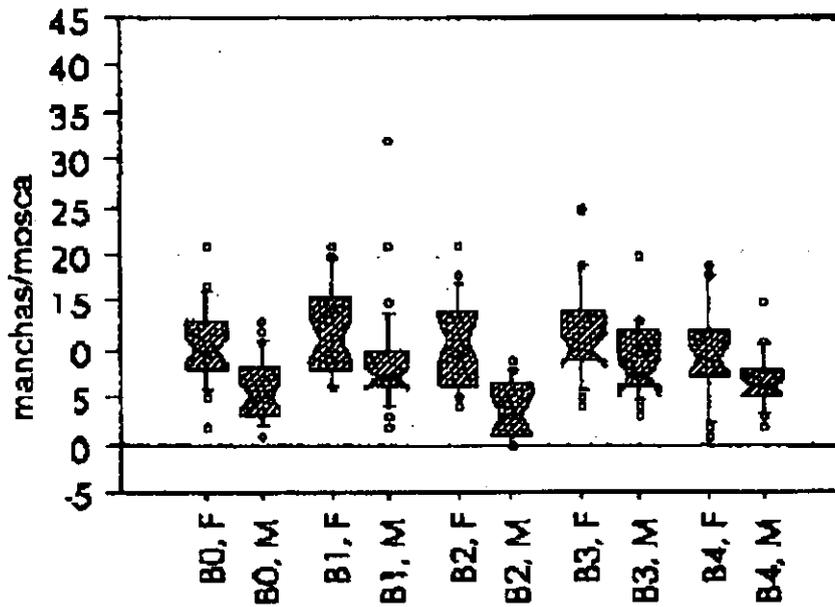


Fig. 3.46. Distribución de los individuos con manchas totales en los pretratamientos (A1) con nitrato de Pb y MMS (C1). En las hembras (F) la distribución y las medianas tienen un valor superior que en los machos (M).

EFEECTO: (B) Pb

Manchas / ala (datos transformados en arcosenoh)

Interacción para arcosenoh (y)

Barras: ± 1 error estándar

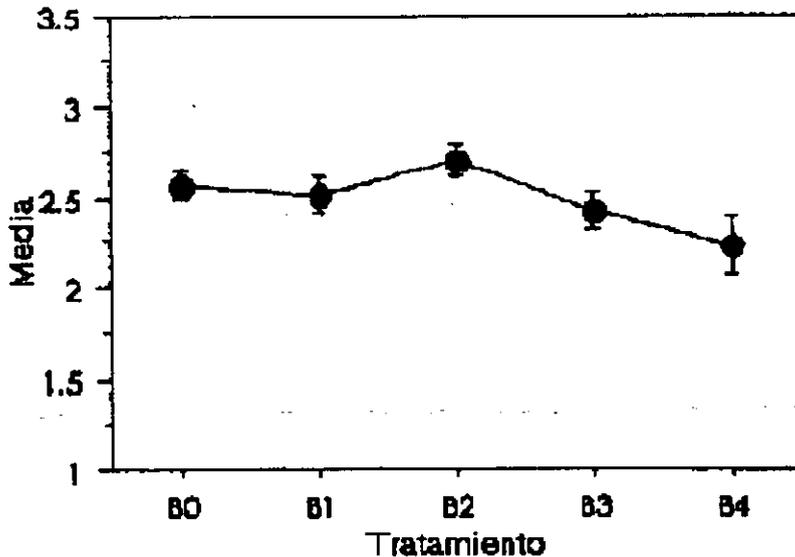


Fig. 3.47. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en el post-tratamiento (A2) con nitrato de Pb y MMS (C1). En (B4) 1 mM los valores son menores que (B0) 0 mM c/mm y (B2) 0.1 mM.

POST-TRATAMIENTO CON NITRATO Pb y 12 mM MMS
 FACTOR : (B) Pb

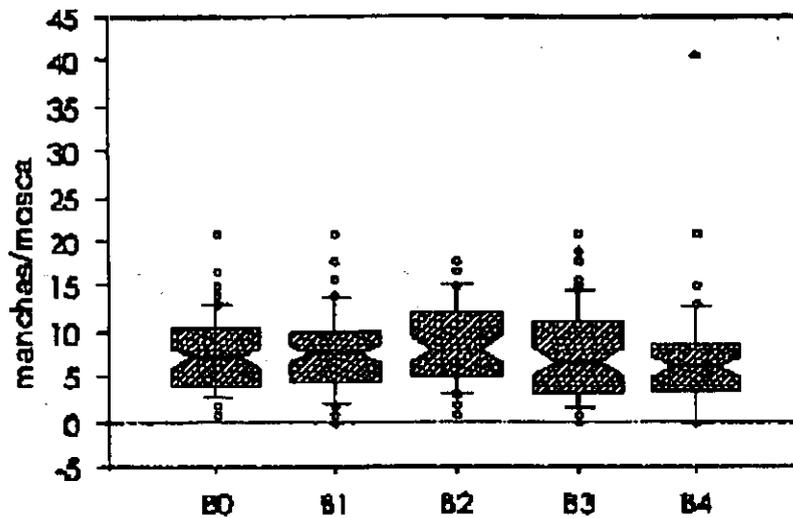


Fig. 3.48. Distribución de los individuos con manchas totales en el post-tratamiento (A2) con nitrato de Pb y MMS (C1). La mediana más baja en (B4) 1 mM.

EFFECTO: (B) Pb * (D) SEXO

Manchas / ala (datos transformados en arcosenoh)

Interacción para arcosenoh (y)

Barras: ± 1 error estándar

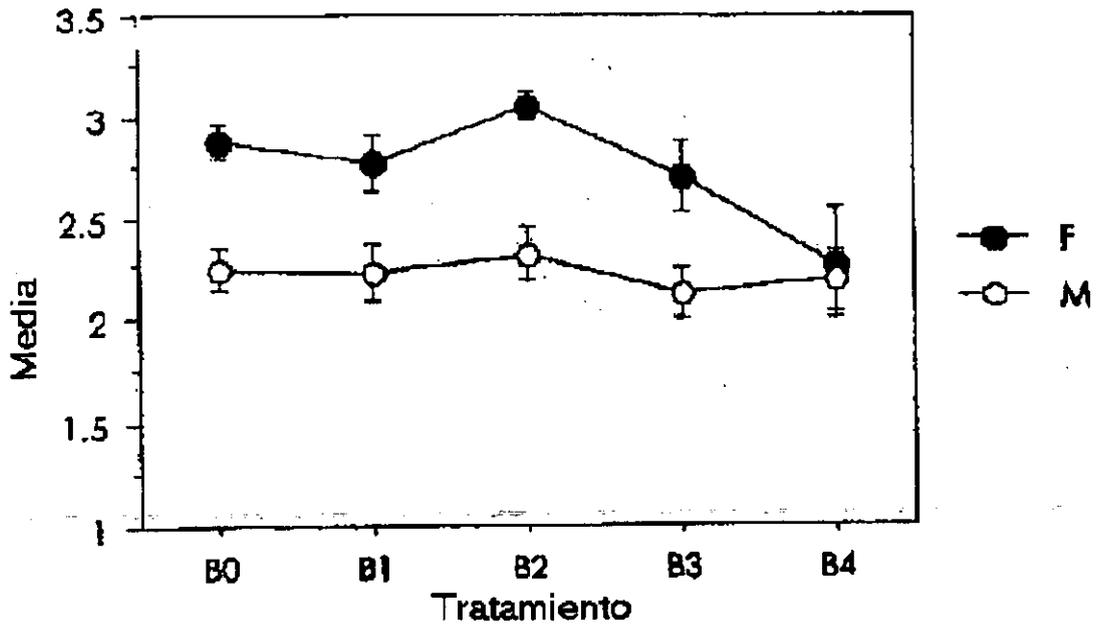


Fig. 3.49. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en los post-tratamientos (A2) con nitrato Pb y MMS (C1). Los valores de las hembras (F) son superiores a los de los machos (M), excepto en (B4) 1mM.

POST-TRATAMIENTO CON NITRATO DE Pb y 12mM MMS
FACTORES : (B) Pb. (F.M) SEXO

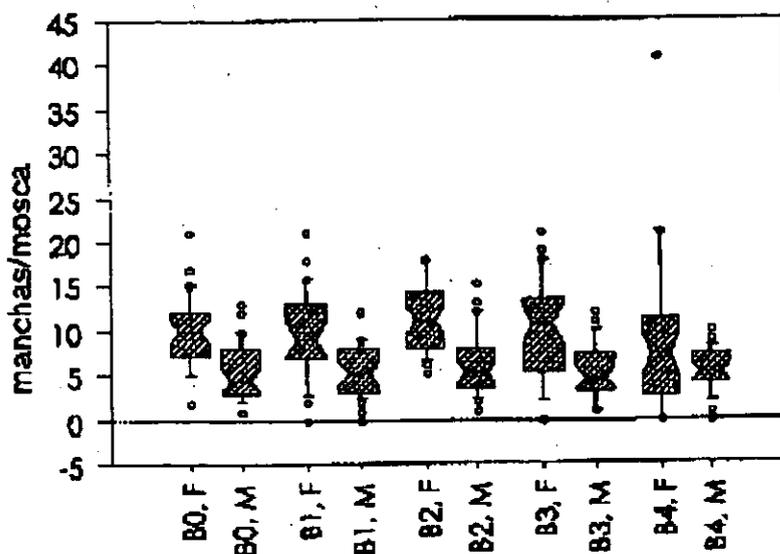


Fig. 3.50. Distribución de los individuos con manchas totales del post-tratamiento (A2) con nitrato de Pb y MMS (C1). En las hembras (F) la distribución es mayor que en los machos (M).

3.3.5. Testigos positivos MMS y uretano

Se hizo el ANOVA de los tratamientos crónicos hechos con MMS y uretano y que sirvieron de testigos positivos (APÉNDICE, Tablas 3.13 y 3.14). Como era de esperarse, los factores MMS y uretano mostraron significancia. Sin embargo el tratamiento crónico MMS 1.2 mM no mostró significancia en el factor Sexo ya que ANOVA no muestra interacción entre MMS * Sexo, ni la corrección de Bonferroni/Dunn. La prueba de U muestra significancia del factor Sexo, sólo cuando se analizan por separado los resultados del testigo agua (C1) del tratamiento MMS (C5) en el que hay mayor número de manchas en las hembras. Por el contrario, con todas las pruebas estadísticas el testigo positivo uretano fue significativo para el factor Sexo, sin embargo no hay interacción Uretano * Sexo. Esto se debe a que sólo con (C4) 20 mM de uretano se obtuvieron diferencias entre hembras y machos. En los siguientes párrafos se presenta la frecuencia y distribución de las manchas totales/individuos obtenidas con estos mutágenos.

Frecuencia y distribución de manchas totales/individuos

Hubo mayor número de manchas con (C2) 5 mM, (C3) 10 mM y (C4) 20 mM de uretano que con el testigo agua (C1) 0 mM. En (C5) 1.2 mM MMS el promedio es notablemente mayor que el de uretano (C4) 20 mM y por supuesto que en (C1) 0 mM (Figs. 3.51 y 3.52). La distribución de individuos coloca las medianas para ambos mutágenos por arriba de (C1). La concentración mayor de uretano (C4) 20 mM y la de MMS (C5) 1.2 mM tienen extensión superior hacia la derecha de la distribución (Figs. 3.53 y 3.54).

Frecuencia y distribución de manchas totales/sexo/individuo

Las interacciones Uretano * Sexo y MMS * Sexo muestran promedios superiores en las hembras de uretano (C4) 20 mM y MMS (C5) 1.2 mM (Figs. 3.55 y 3.56). La distribución de los testigos agua (C1) 0 mM no mostró diferencias entre ambos sexos. Las hembras

mostraron una tendencia hacia la derecha, con la mayor distribución en (C4) 20 mM uretano (Fig. 3.57) y (C5) 1.2 mM MMS (Fig. 3.58).

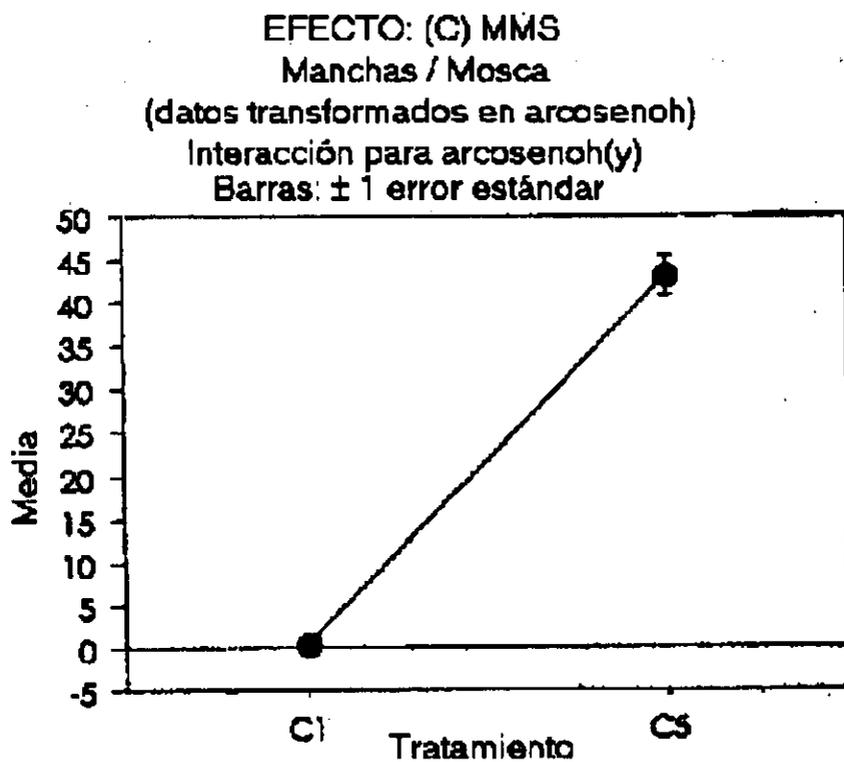


Fig. 3.51. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en el testigo positivo MMS. El valor de (C5) 1.2 mM es significativo con respecto a (C1) 0 mM.

EFFECTO: (C) URETANO
Manchas / mosca (datos transformados en arcosenoh)
Interacción para arcosenoh(y)
Barras: ± 1 error estándar

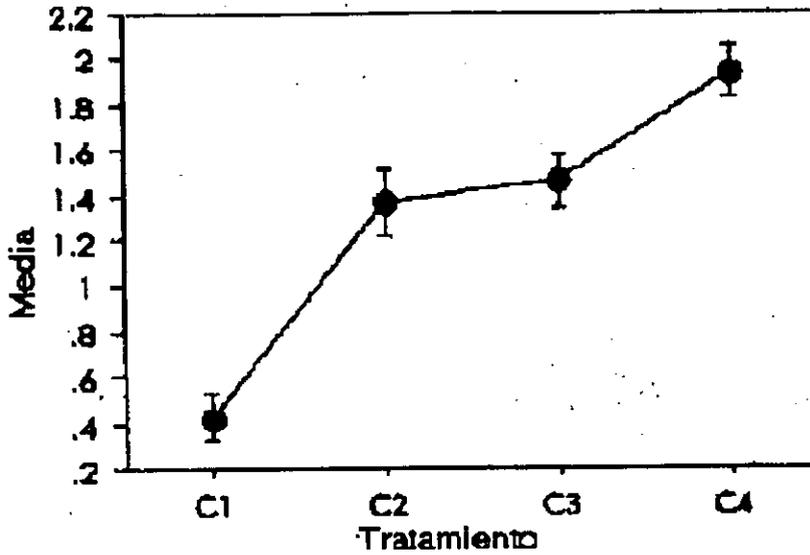


Fig. 3.52. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en el testigo positivo uretano. Los valores de (C2) 5 mM, (C3) 10 mM y (C4) 20 mM son diferentes a (C1) 0 mM. La media de (C4) 20 mM es la mayor.

TESTIGO POSITIVO MMS
FACTOR: (C) MMS

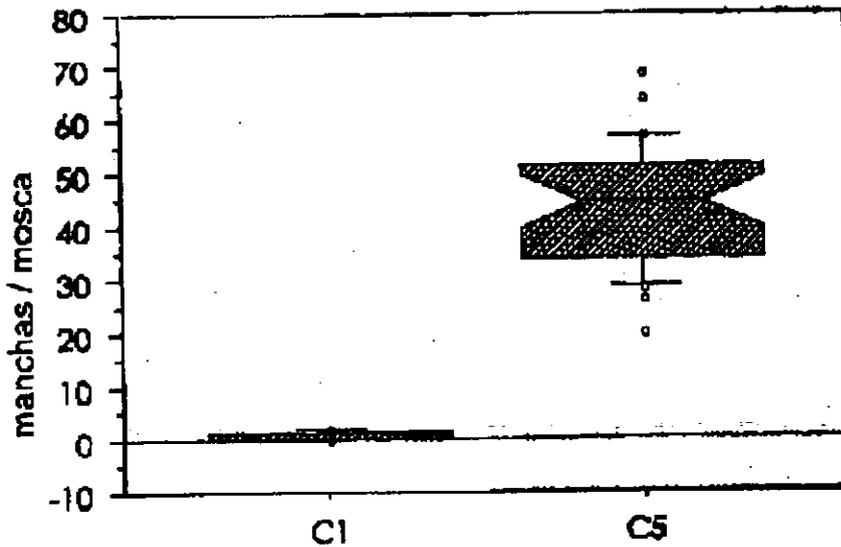


Fig. 3.53. Distribución de los individuos con manchas totales en el testigo positivo MMS. Esta distribución y el valor de la mediana es mayor en (C5) 1.2 mM que en (C1) 0 mM.

TESTIGO POSITIVO URETANO
FACTOR: (C) URETANO

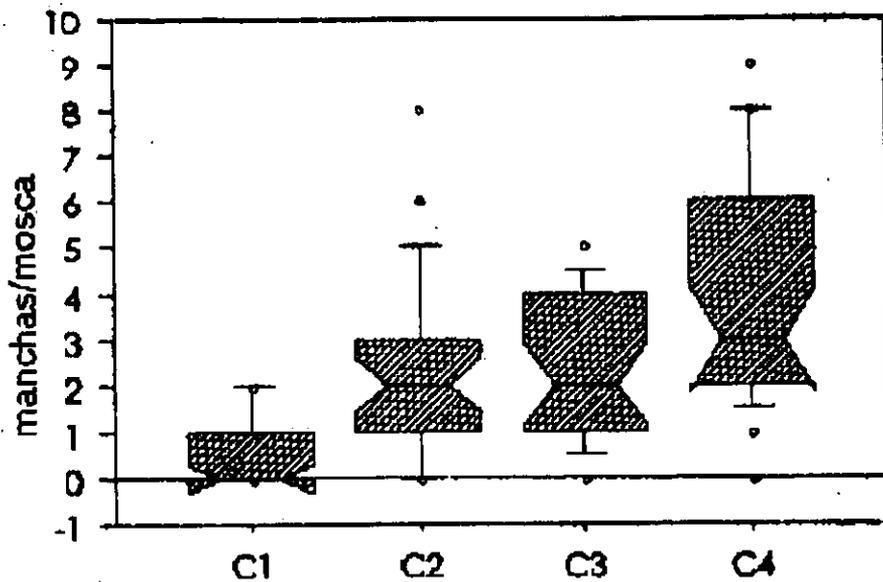


Fig. 3.54. Distribución de los individuos con manchas totales en el testigo positivo uretano. Ésta y el valor de las medianas aumentan con la concentración del promutágeno.

EFEECTO: (C) MMS * (D) SEXO

Interacción para manchas / mosca (y)

Datos transformados en arcosenoh

Barra: ± 1 error estándar

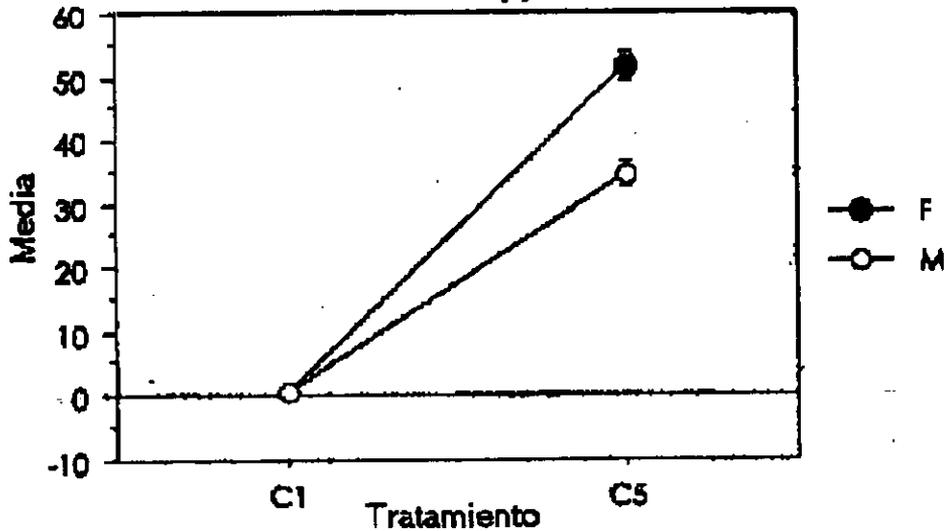


Fig. 3.55. Interacción de los promedios o medias aritméticas de manchas totales/individuo (arcosenoh) en el testigo positivo MMS. En (C5) 1.2 mM las hembras (F) tienen un valor superior con respecto a los machos (M).

EFFECTO : (C) URETANO * (D) SEXO
 Manchas / mosca (datos transformados en arcosenoh)
 Interacción para arcosenoh(y)
 Barras: ± 1 error estándar

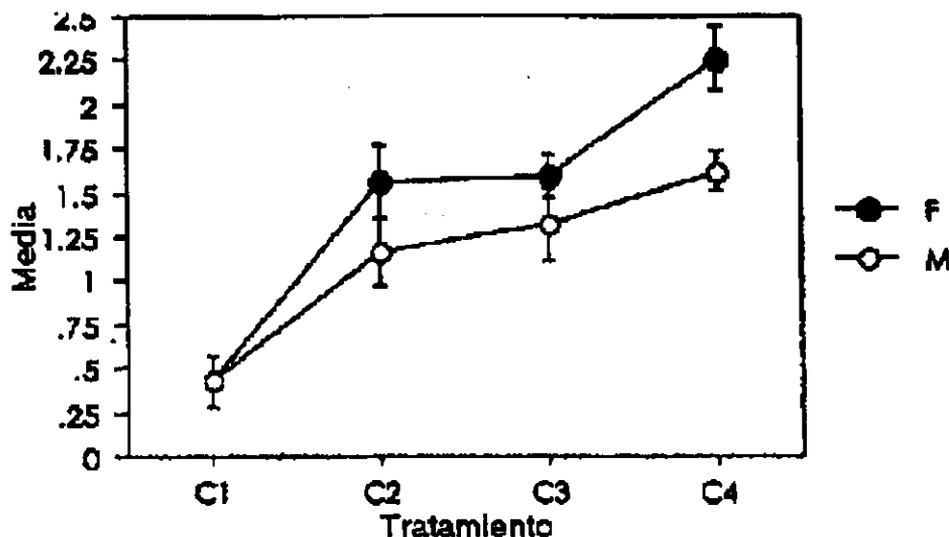


Fig. 3.56. Interacción de los promedios o medias aritméticas de las manchas totales/individuo (arcosenoh) en el testigo positivo uretano. Sólo en (C4) 20 mM hay diferencias entre las hembras (F) y los machos (M).

TESTIGO POSITIVO MMS
 FACTORES: (C) MMS, (D) SEXO

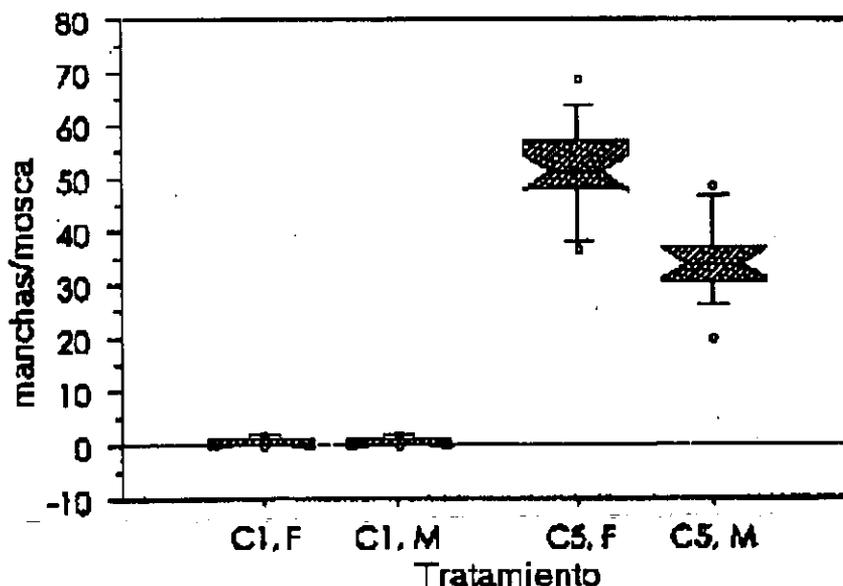


Fig. 3.57. Distribución de los individuos con manchas totales/individuo en el testigo positivo MMS. En (C5) 1.2 mM la distribución y la mediana son mayores en las hembras (F) que en los machos (M).

TESTIGO POSITIVO URETANO
FACTORES : (C) URETANO, (D) SEXO

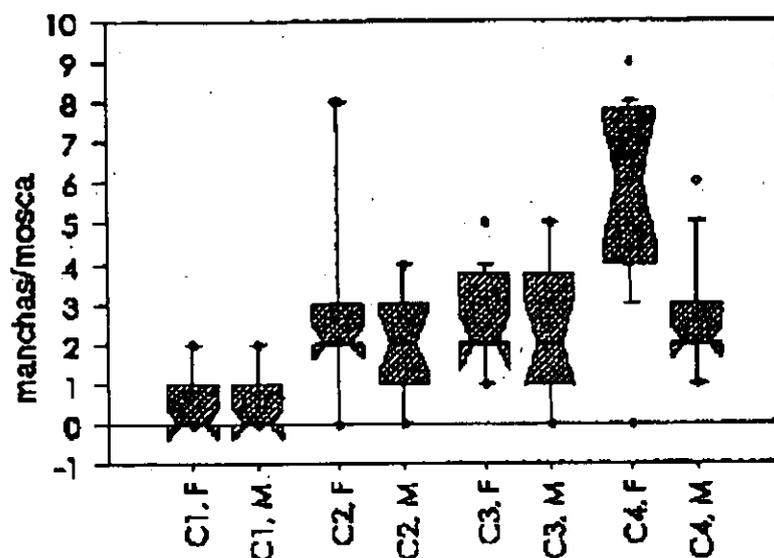


Fig. 3.58. Distribución de los individuos con manchas totales/individuo en el testigo positivo uretano. Las medianas aumentaron con el mutágeno y en C4 (20 mM) el valor es mayor en las hembras (F) que en los machos (M).

3.4. Diferencias en la frecuencia del total de manchas en machos y hembras

Se analizó con la prueba de U la frecuencia global de manchas totales/individuo en machos y hembras, en las series de tratamientos con Ca^{2+} o Pb^{2+} (APÉNDICE, Tabla 3.15). Con el método de Bonferroni-Dunn se analizaron las interacciones MMS * Sexo y Uretano * Sexo (APÉNDICE, Tablas 3.16 y 3.17). Se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos con las sales metálicas, excepto en el post-tratamiento sin MMS.

En los testigos MMS y uretano se analizaron por separado las frecuencias de (C1) 0mM y los tratamientos, encontrándose diferencias en (C5) 1.2 mM de MMS y (C2) 5 mM, (C3) 10 mM y (C4) 20 mM de uretano.

3.5. Frecuencia, tamaño y distribución de los clones *mwh*

Se analizó la frecuencia más alta de los clones *mwh*, su tamaño (1,2,3-4,5-8,9-16,17-32,33-64,-128,-256 y >256 células) y su distribución según Graf,1995. Los tratamientos sin MMS (Figs. 3.59 a 3.62) presentaron la frecuencia mayor de manchas en los clones pequeños (1 y 2 células) de manera semejante a los resultados de la concentración (C1) 0 mM de los testigos MMS y uretano (Fig. 3.67 y 3.68). Los tratamientos con MMS y metales presentaron clones dentro de un rango que incluye (3-4 a 9-16 células) al del testigo MMS (C5) 1.2 mM (3-4 células) (Figs 3.63 a 3.66) (APÉNDICE, Tablas 3.18 a 3.20).

La distribución de los clones *mwh* en los tratamientos MMS 12 mM fue de 1 a 33-64 células y cuando se alimentaron las larvas con sales se encontraron clones de tamaño heterogéneo oscilando entre 1 a -128 y 1 a <256 células (Figs.3.59 a 3.66; APÉNDICE, Tablas 3.21 a 3.23). En el testigo MMS de 1.2 mM la distribución fue de 1 a -128 células (Fig.3.67), en uretano las manchas de mayor tamaño se encontraron en 10 mM con 1 a -128 células (Fig.3.68).

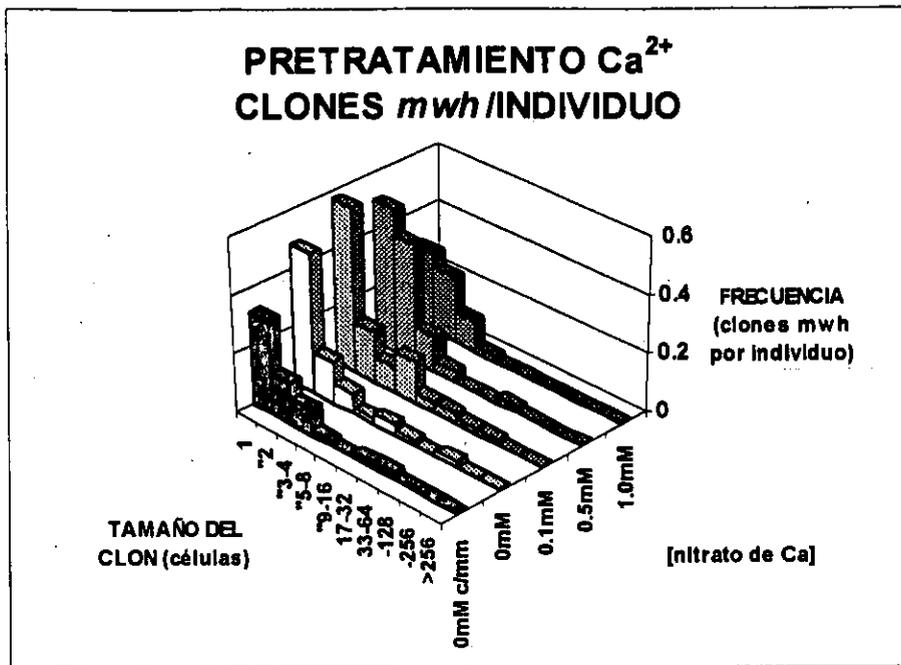


Fig. 3.59. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el pre-tratamiento con Ca^{2+} . La frecuencia máxima está en los clones de 1 célula. En 0 y 0.1 mM está la distribución máxima (1 a 128 céls.) y en 1 mM está la mínima distribución (1 a 5-8 céls.).

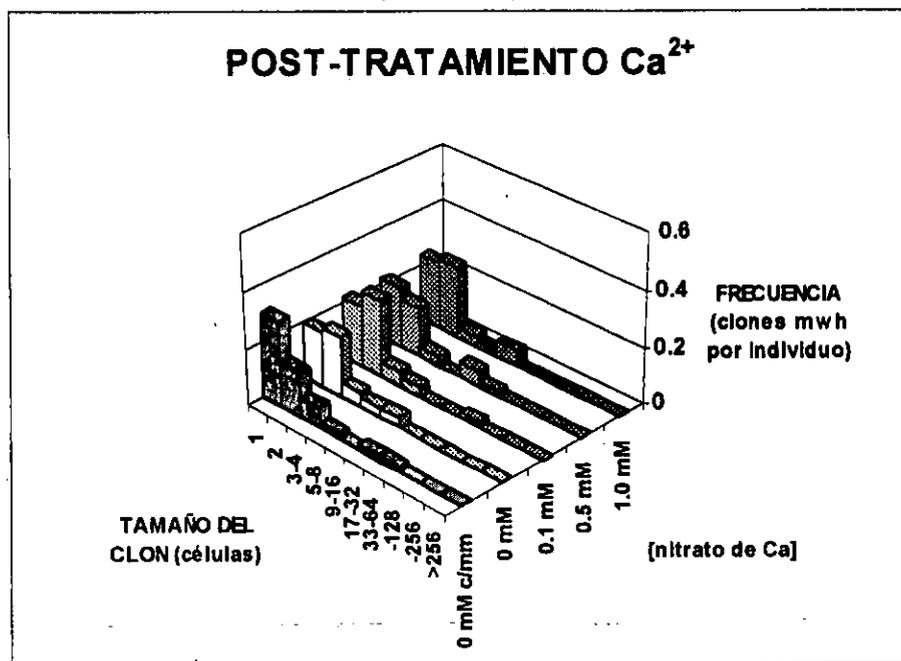


Fig. 3.60. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el post-tratamiento con Ca^{2+} . La frecuencia máxima está en los clones de 1 célula. En 0 y 0.1 mM está la distribución máxima (1 a 128 céls.) y en 1 mM está la mínima distribución (1 a 5-8 céls.).

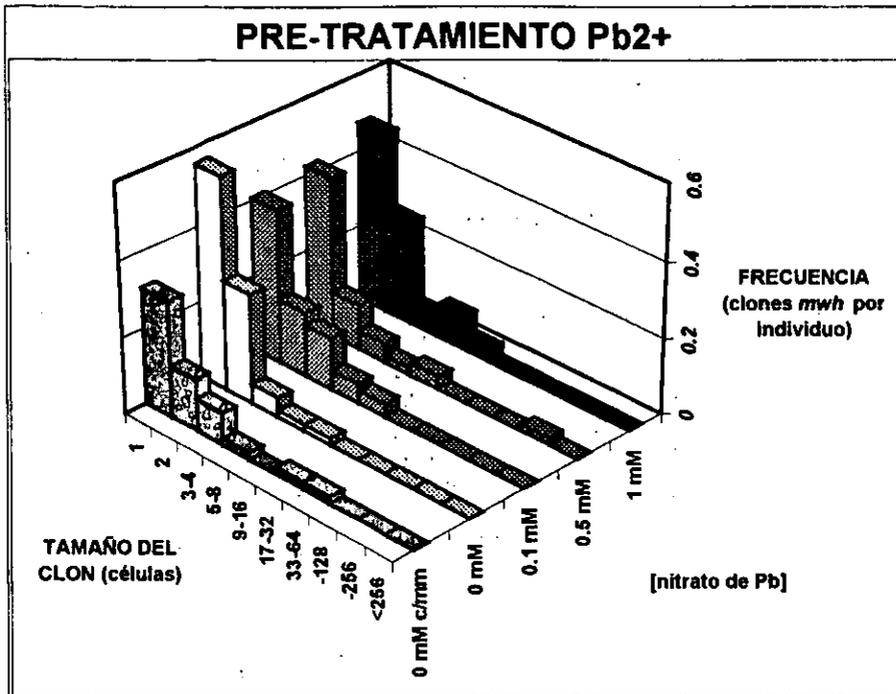


Fig. 3.61. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el pretratamiento Pb²⁺. La frecuencia máxima en los clones de 1 célula. La distribución máxima en 0.5 mM (1 a 256 céls.) y mínima en 0, 0.1 y 1 mM (1 a 9-16 céls.).

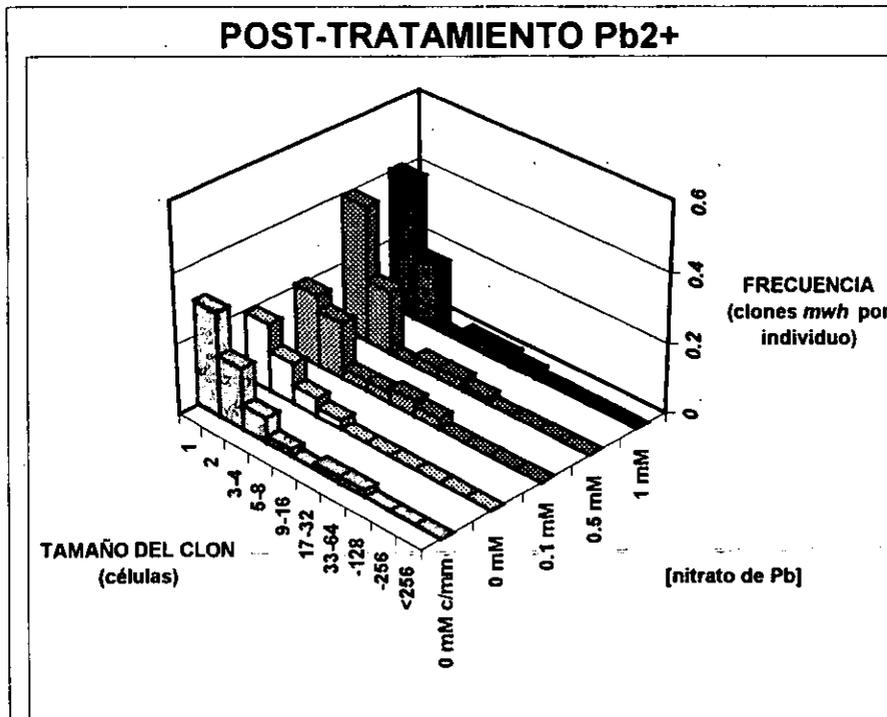


Fig. 3. 62. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el post-tratamiento Pb²⁺. La frecuencia máxima está en los clones de 1 célula. La distribución máxima en 0 mM s/m (1 a 33-64 céls.) y la mínima 0 mM (1 a 5-8 céls.).

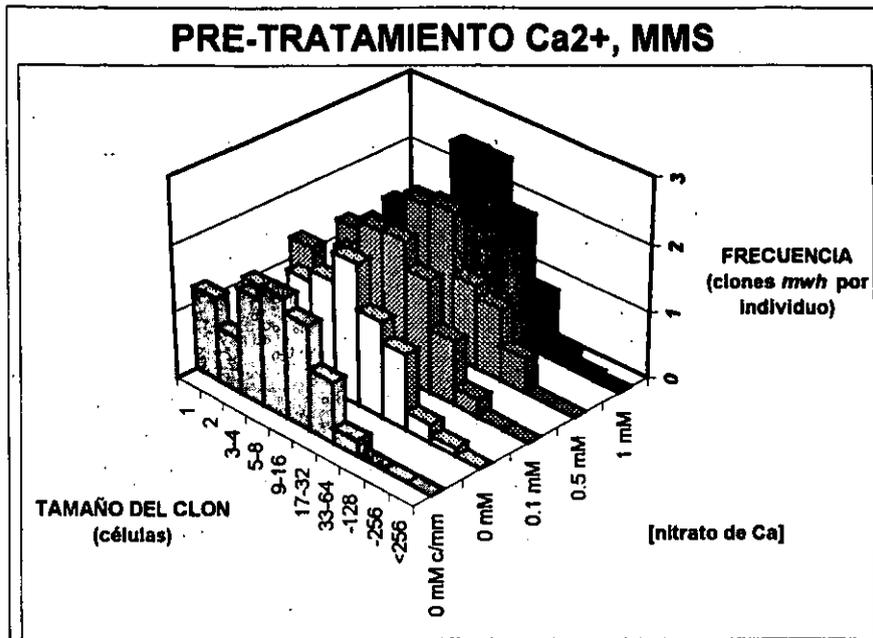


Fig. 3.63. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el pretratamiento Ca²⁺, MMS. Las frecuencias máximas están en los clones de 5-8 y 9-16 células. La distribución es máxima en 0, 0.1 y 0.5 mM (1 a 256 céls.). En 0 mM s/m se observa la mínima distribución (1 a 33-64 céls.).

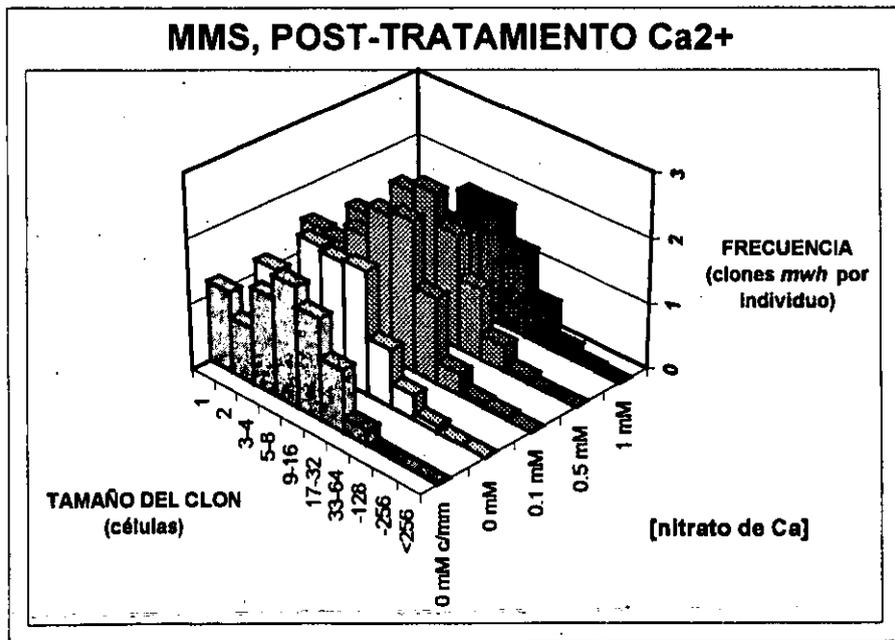


Fig. 3.64. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el post-tratamiento MMS, Ca²⁺. Las frecuencias máximas están en los clones de 3-4, 5-8 y 9-16 células. La distribución máxima en 0.1 y 1 mM (1 a 256 céls.) y la mínima en 0 mM s/m (1 a 33-64 céls.).

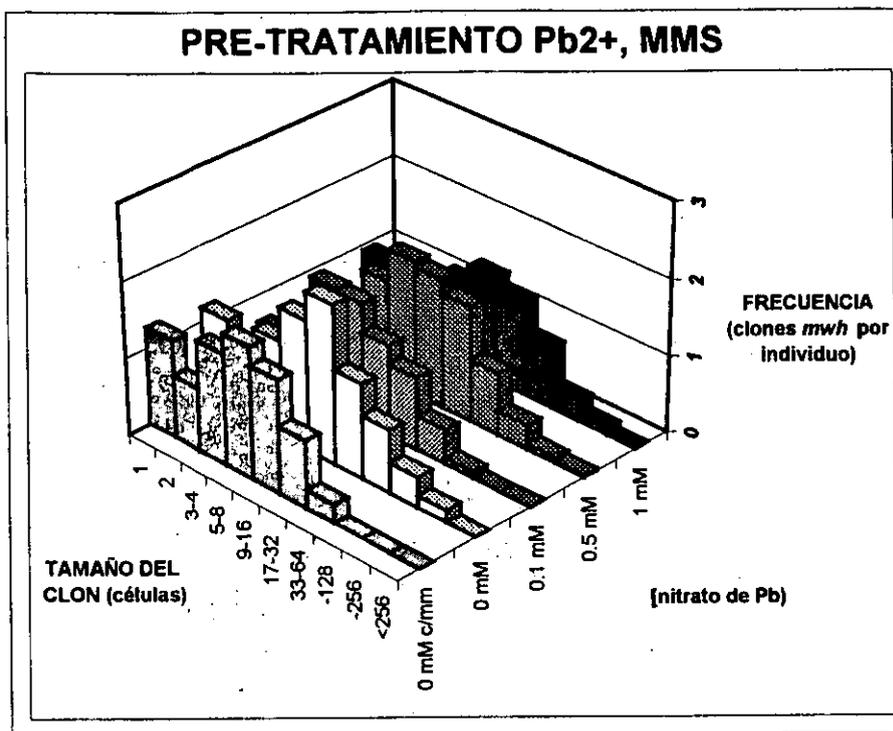


Fig. 3.65. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el pre-tratamiento Pb²⁺, MMS. Las frecuencias máximas están en los clones de 5-8 y 9-16 células. La distribución máxima en 0.5 mM (1 a >256 céls.) y la mínima en 0 mM s/m (1 a 33-64 céls.).

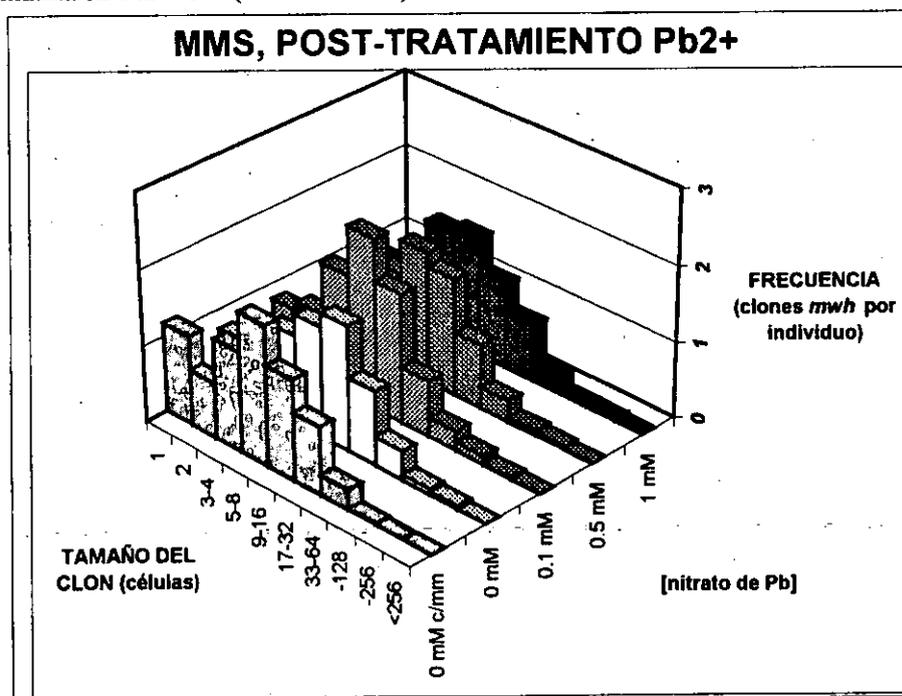


Fig. 3.66. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en el post-tratamiento MMS, Pb²⁺. Las frecuencias máximas están en los clones de 5-8 y 9-16 células. La distribución máxima en 0, 0.1, 0.5 y 1 mM (1 a 256 céls.) y la mínima en 0 mM s/m (1 a -128 céls.).

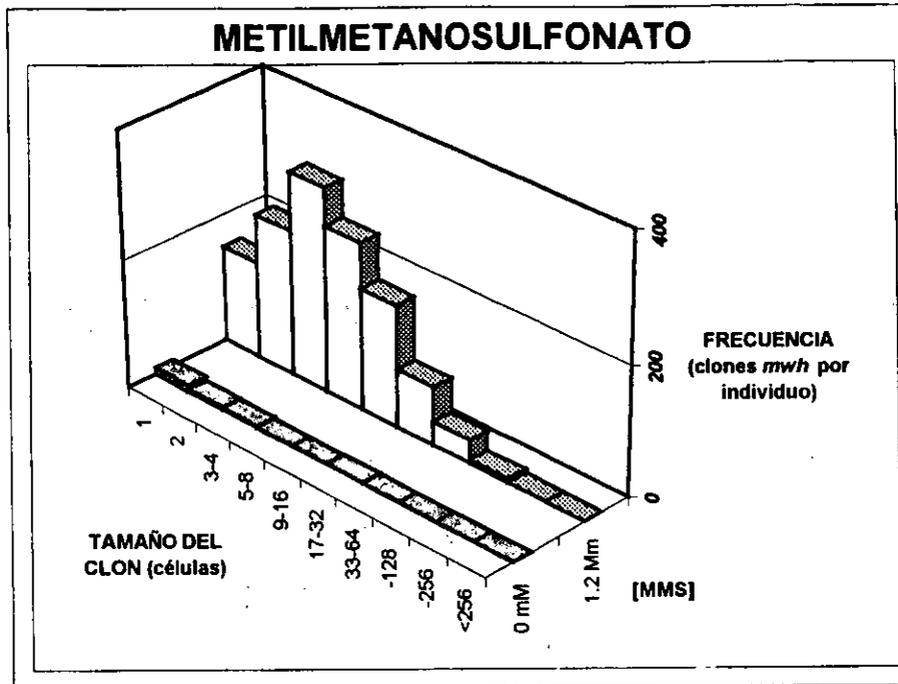


Fig. 3.67. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en larvas alimentadas con 1.2 mM de MMS de las 72 h de edad hasta el final del III estadio. La frecuencia máxima en los clones de 3-4 céls. y la distribución se extiende hasta -128 céls.

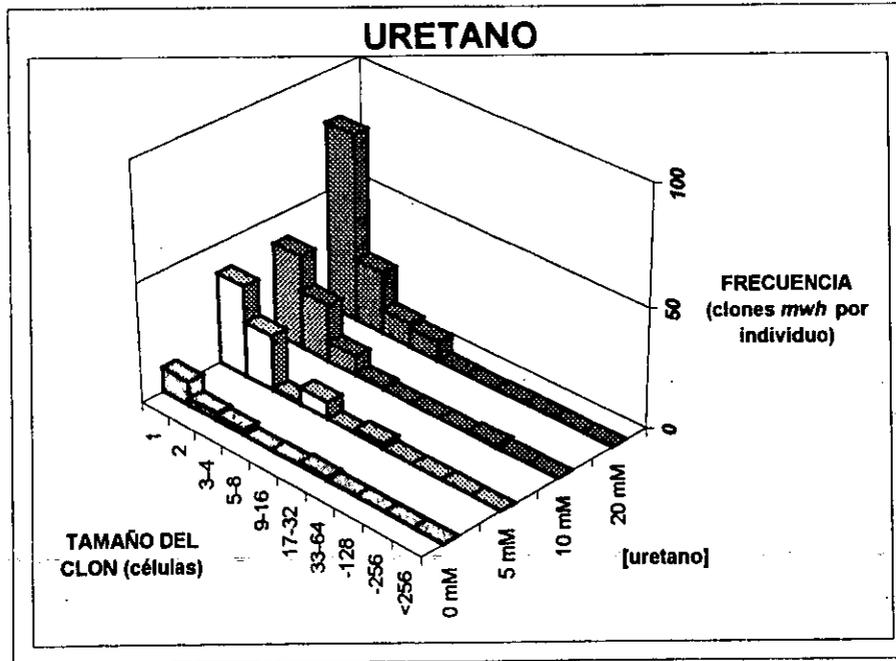


Fig. 3.68. Tamaño y distribución de los clones *mwh*/individuo en larvas alimentadas con uretano de las 72 h de edad hasta el final del III estadio. La frecuencia máxima está en los clones de 1 cél. (20 mM) y la distribución se extiende hasta -128 céls (10 mM).

3.6. Frecuencia de las manchas gemelas por individuo

Con la prueba del ala (SMART) los valores significativos para gemelas/individuo fueron pretratamiento (A1) 1 mM con Pb y testigos positivos, uretano 20 mM y MMS 1.2 mM. Las frecuencias de las manchas gemelas/individuo/sexo no fueron analizadas de forma particular con ninguna prueba estadística. A continuación se representan gráficamente las frecuencias de las manchas gemelas/individuo (totales) y gemelas/individuo/sexo (hembras y machos).

La frecuencia fue mayor en los tratamientos con MMS que sin MMS (Figs. 3.69 y 3.70). Esto es resultado del efecto alquilante directo del MMS sobre el ADN. Se sabe que la presencia de bases con grupos alquilos pueden provocar además de los sitios AP, rompimientos en los enlaces azúcar-fosfato que generan rompimientos simples y dobles. La reparación de estos rompimientos por recombinación de homólogos (HRR) es una fuente de producción de manchas gemelas.

Las proporciones de manchas gemelas entre hembras y machos obtenidas en las series sin MMS mostraron resultados heterogéneos ya que en los tratamientos con Ca^{2+} se presenta esta diferencia sólo en 5 de 10 tratamientos (Fig. 3.71) y con el Pb^{2+} en 6 de 10 tratamientos (Fig. 3.72). Estos resultados son difíciles de explicar porque las fuentes de esta variabilidad pueden ser externas e internas. Como fuentes internas están, entre otras, la accesibilidad de los cationes al interior de la célula, la influencia de los mecanismos de homeostasis que deben dispararse con la ingestión de concentraciones altas estos metales y la posible interacción de los metales con proteínas que se activan o desactivan con cationes divalentes, como la cinasa de la DNA-PKcs que interviene en HRR.

En las series con sales metálicas y MMS hubo aumento de manchas gemelas, un mayor número de manchas en hembras y heterogeneidad en los machos. El que las manchas gemelas hayan sido más abundantes en los pretratamientos apoya la hipótesis de un evento oxidante provocado por la manipulación de las larvas. Por otro lado, la hipersensibilidad al MMS mayor en hembras, podría derivar de la presencia de un elemento sensible al MMS que participe en HRR.

El pretratamiento con Ca^{2+} y MMS produjo mayor frecuencia de este tipo de manchas que el post-tratamiento con MMS (Fig. 3.73). En las series de Pb^{2+} el mayor número de manchas gemelas en hembras se encontró en el pretratamiento con 0 mM (B1), en tanto que con las concentraciones de Pb^{2+} se observó una tendencia a la disminución de la diferencia entre las hembras y los machos (Fig. 3.74). Estas tendencias sugieren un efecto modulador de estos metales. Sin embargo esto no fue demostrado con el análisis de las manchas totales/individuo con ANOVA y las pruebas no paramétricas

En el testigo positivo MMS (C5) 1.2 mM la frecuencia total de manchas gemelas/individuo fue mucho mayor que en (C1) 0 mM, pero no se observa la diferencia entre las frecuencias de hembras y machos (Fig. 3.75). En este tratamiento crónico, aunque la concentración del alquilante es menor, permite una mayor exposición de las larvas al mutágeno, por lo que la frecuencia total de manchas gemelas es muy superior a la obtenida con el tratamiento agudo. Con éste sí se obtiene una aparente diferencia entre hembras y machos, aún en los testigos c/mm. Lo anterior podría explicarse como resultado de la concentración 12 mM MMS. Se han reportado genes que no son sensibles a dosis bajas de MMS y que sólo se expresan en dosis altas del mutágeno (APÉNDICE, Tabla 1.1).

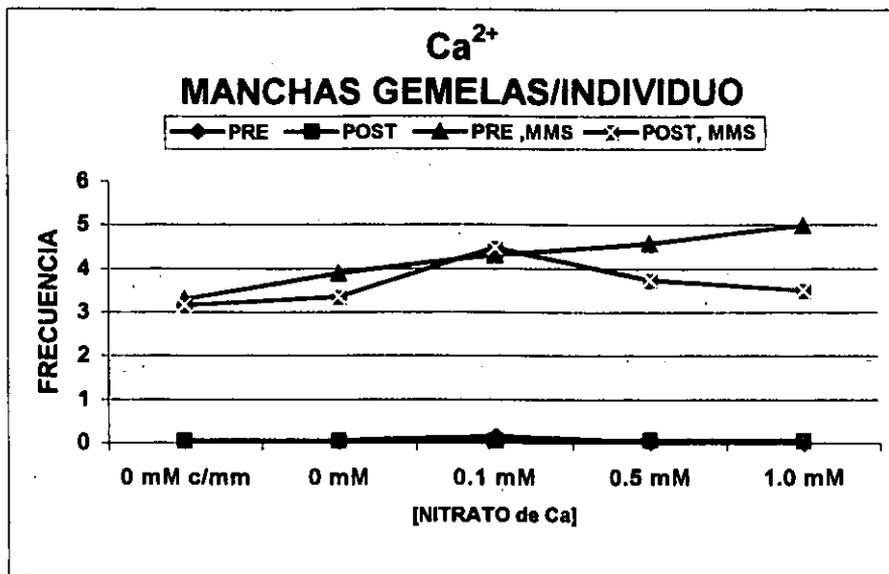


Fig. 3.69. Efecto del Ca²⁺ sobre la frecuencia de manchas gemelas/individuo después de alimentar a larvas de 48 h (pretratamiento) o 74 h (post-tratamiento) con nitrato de calcio con y sin MMS a las 72 h. Hay una tendencia a mayor número de manchas en Pre-MMS vs Post-MMS. Los tratamientos sin MMS no presentaron diferencias entre sí.

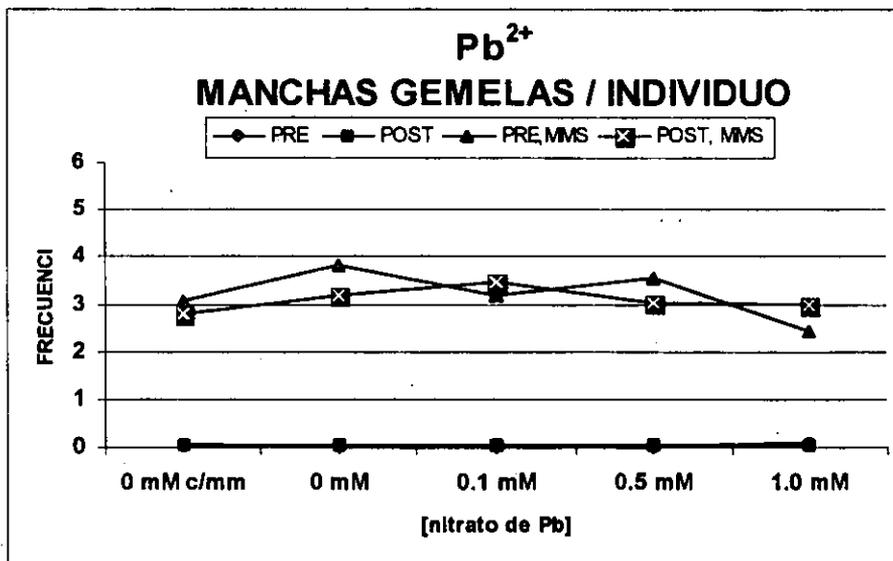


Fig. 3.70. Efecto del Pb²⁺ sobre la frecuencia de manchas gemelas / individuo después de alimentar a larvas de 48 h (pretratamiento) o a las 74 h (post-tratamiento) con nitrato de plomo con y sin MMS a las 72 h.

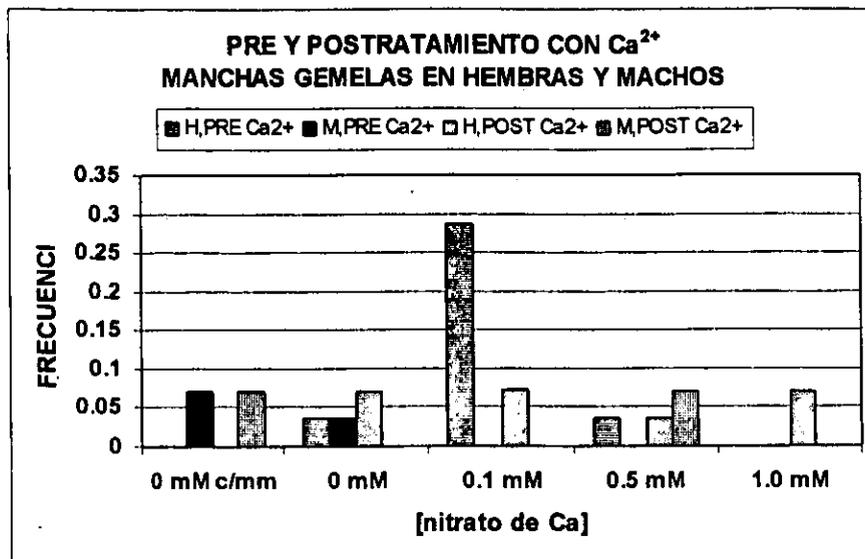


Fig. 3.71. Efecto del Ca^{2+} sobre la frecuencia de las manchas gemelas/individuo en hembras (H) y machos (M), después de alimentar a larvas de 48 h (pretratamiento) o de 74 h (post-tratamiento) con nitrato de calcio, sin MMS (C0). Sólo en 5 de 10 tratamientos la frecuencia de manchas es mayor en las hembras

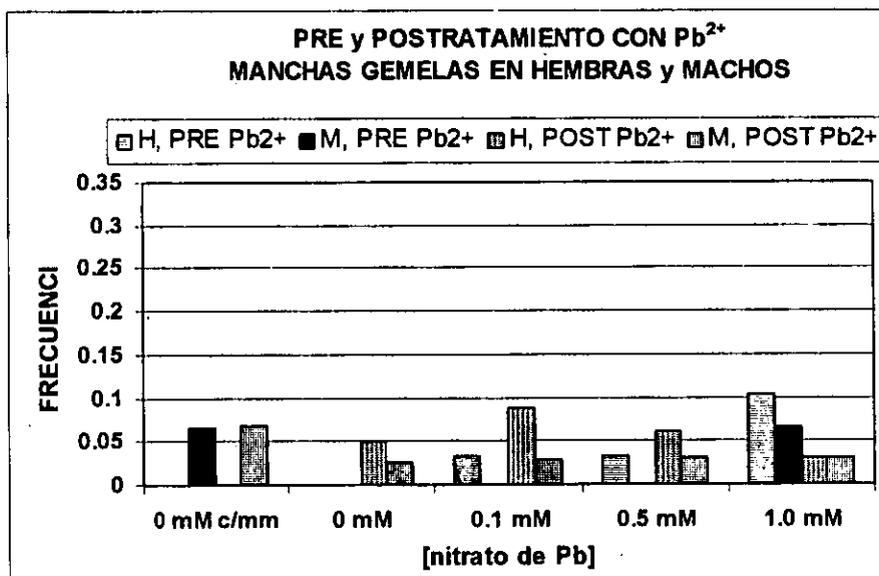


Fig. 3.72. Efecto del Pb^{2+} sobre la frecuencia de las manchas gemelas/individuo/sexo después de alimentar a larvas de 48 h (pretratamiento) o de 74 h (post-tratamiento) con nitrato de plomo, sin MMS (C0). Sólo en 6 de 10 tratamientos se observa una frecuencia mayor en las hembras.

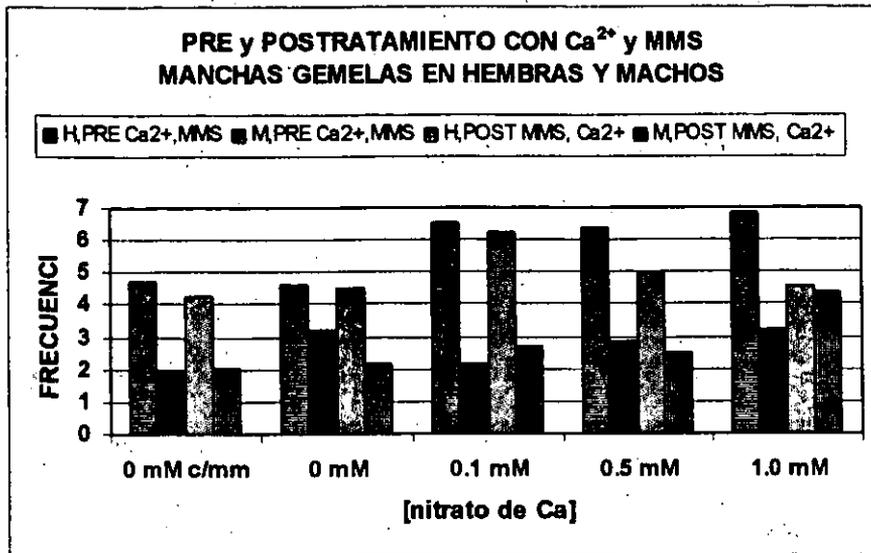


Fig. 3.73. Efecto del Ca^{2+} sobre la frecuencia de las manchas gemelas/individuo/sexo después de alimentar a larvas de 48h (pretratamiento) o de 74 h (post-tratamiento) con nitrato de calcio y MMS a las 72 h. Se observa una frecuencia mayor en las hembras de testigos y tratamientos.

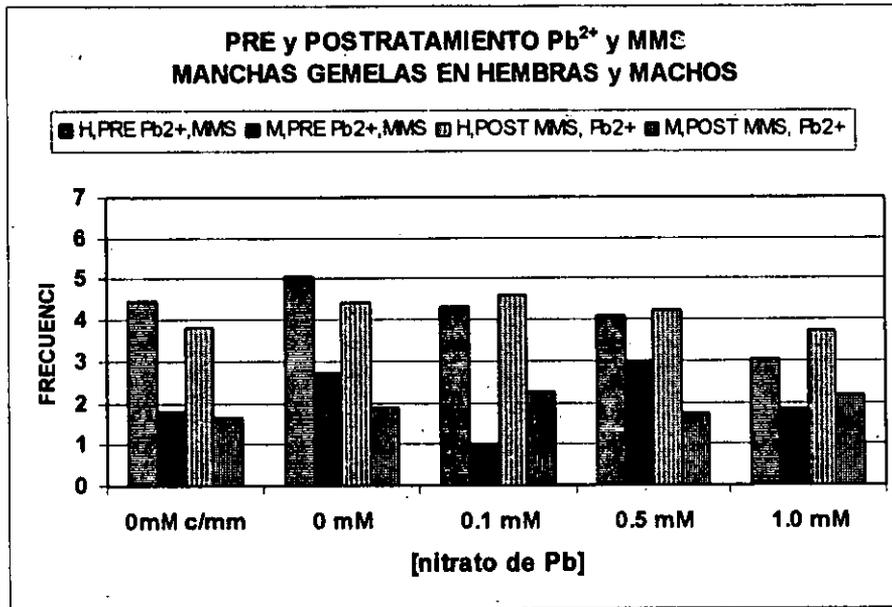


Fig. 3.74. Efecto del Pb^{2+} sobre la frecuencia de las manchas gemelas / individuo en hembras (H) y machos (M) después de alimentar a larvas de 48 h (pretratamiento) o de 74 h (post-tratamiento) con nitrato de plomo y MMS a las 72 h. Se observa una frecuencia mayor en las hembras de testigos y tratamientos.

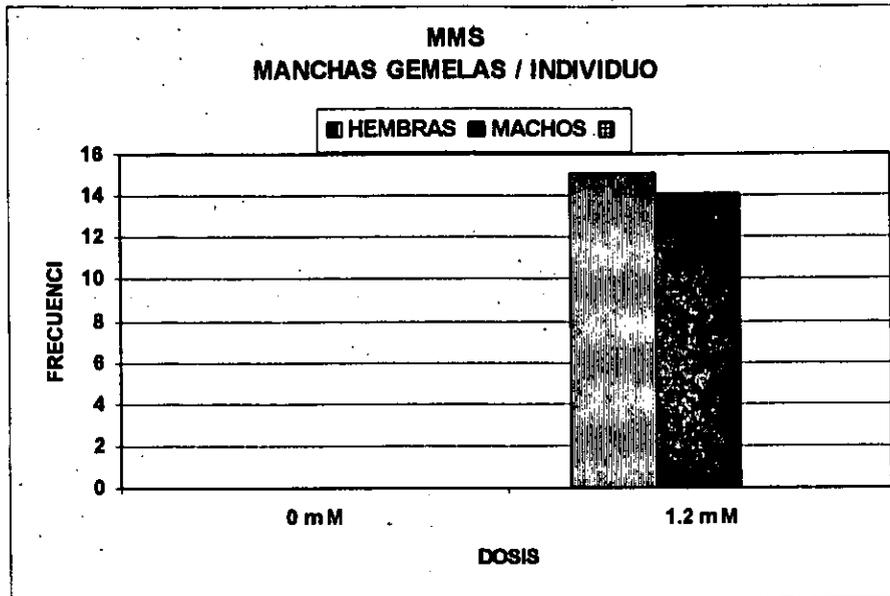


Fig. 3.75. Frecuencia de las manchas gemelas/individuo en hembras y machos después de alimentar las larvas con MMS de las 72 h al final del III estadio. Las frecuencias en hembras y machos fueron 15.067 y 14.133 respectivamente.

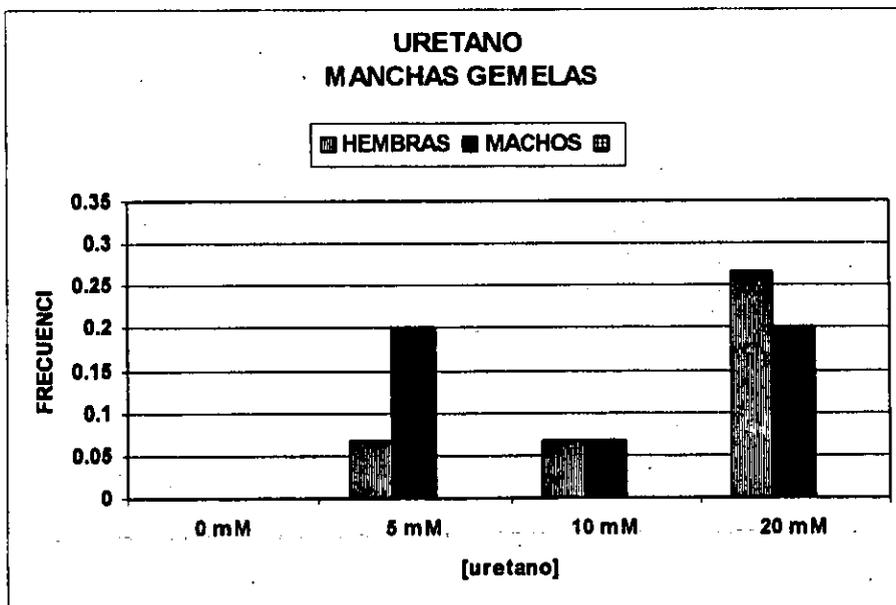


Fig.3.76. Frecuencia de las manchas gemelas/individuo en hembras y machos después de alimentar con uretano larvas de las 72 h al final del III estadio. Hay una heterogeneidad: en 5 mM la frecuencia es mayor en machos, los valores son iguales en 10 mM y en 20 mM ésta es mayor en las hembras.

En el testigo positivo uretano hubo heterogeneidad representada por mayor frecuencia en machos de (C2) 5 mM, valores iguales con (C3) 10 mM y mayores en hembras del tratamiento (C4) 20 mM (Fig. 3.76). Esto indica que la sensibilidad de los sexos para manchas gemelas depende de la concentración del promutágeno.

La frecuencia de manchas gemelas/individuo con uretano fue notablemente más baja que con el MMS. Ya se ha mencionado que el primero es un promutágeno que debe ser activado por la familia de enzimas Citocromo P450 para provocar un efecto genotóxico. En las moscas de la cruce estándar los genes para estas enzimas son regulados y la activación xenobiótica no es muy alta. De ahí que las frecuencias de manchas gemelas sean mucho más bajas que con MMS, que es un agente alquilante directo. Con estas frecuencias bajas se comprobó que la línea *flr³/TM3, Bd⁵* que se usó para la cruce estándar tiene regulados los genes del Citocromo P450.

3.7. Interpretación de los resultados de ANOVA factorial

Interpretar y explicar los resultados de ANOVA de cuatro factores es una tarea complicada. Un experimento factorial permite la separación y evaluación de los efectos de cada uno de dos o más factores, que afectan a cada una de las unidades experimentales. Lo anterior permite además, la detección de los efectos de interacción entre dos o más factores. La interacción se da cuando el factor 1 puede tener efectos diversos si actúa en presencia de del factor 2, a diferencia de cuando este último no está presente (Scheffler, 1981).

En las Tablas 2.1 y 2.2 de la sección de Materiales y Métodos se presentaron los factores y niveles considerados en este trabajo. La complejidad derivada de éste y su análisis, puede reducirse al analizar por separado, con ANOVA, los datos de:

- a) Manchas obtenidas con los experimentos (B1 a B4), *sin los testigos de manipulación mínima (c/mm B0)*
- b) Manchas obtenidas *entre* los testigos con manipulación mínima (c/mm B0) y los testigos paralelos (B1).

En párrafos anteriores se ha destacado la influencia que los testigos con manipulación pudieran tener en los resultados descritos. Para demostrar si la diferencia se mantiene eliminando este testigo se hizo el ANOVA de las manchas obtenidas con los experimentos (B1 a B4), *sin los testigos de manipulación mínima (c/mm B0)* (APÉNDICE, Tablas 3.24 y 3.25). Las diferencias causadas por un número mayor de manchas en los pretratamientos y en las hembras se mantienen presentes. Esto ocurrió igual para ambos nitratos. Se demuestra que los factores Ca y Pb no son significativos y que hay más interacciones significativas con el nitrato de Pb, lo cual se explica por la heterogeneidad ya descrita antes. Lo importante de este análisis es que aún quitando el testigo B0 se mantienen las diferencias encontradas previamente, con ambos nitratos.

3.7.1. ANOVA de manchas totales/individuo en los tratamientos B1, B2, B3 y B4

Interacción para arcsenoh(y). Efecto (C) MMS * (A) Tratamiento * (B) Ca(NO3)2 * (D) Sexo
 Barra: ± 1 Error estándar

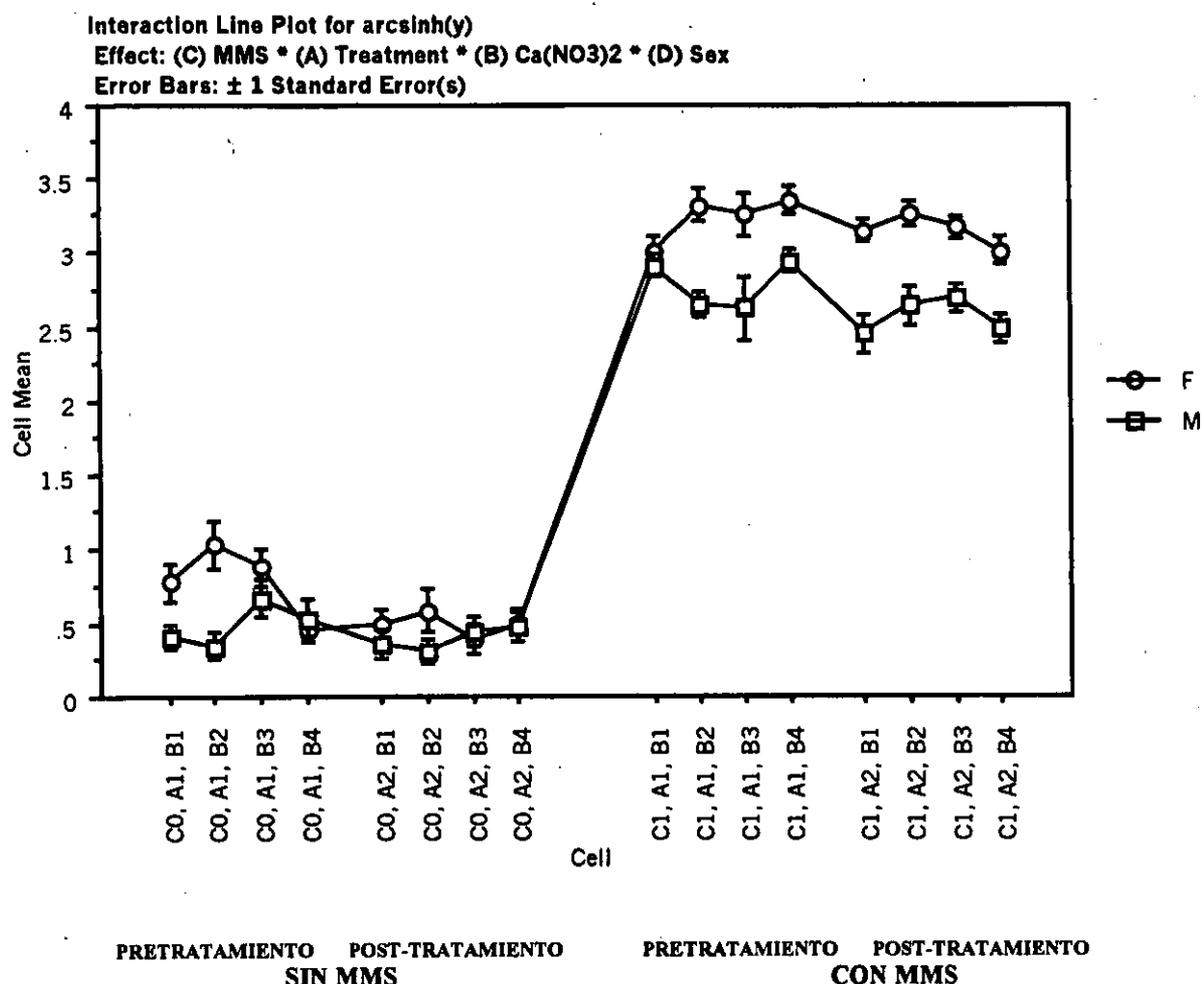


Fig. 3.77. Interacciones de los promedios o medias aritméticas de las manchas totales/individuo(y) en los tratamientos con nitrato de Ca, sin y con MMS. Se excluyeron los testigos con manipulación mínima (c/mm). Los valores son mayores en los pretratamientos y las hembras.

Interacción para arcsinh(y). Efecto (C) MMS * (A) Tratamiento * (B) Pb(NO3)2 * (D) Sexo
Barra: ± 1 Error estándar

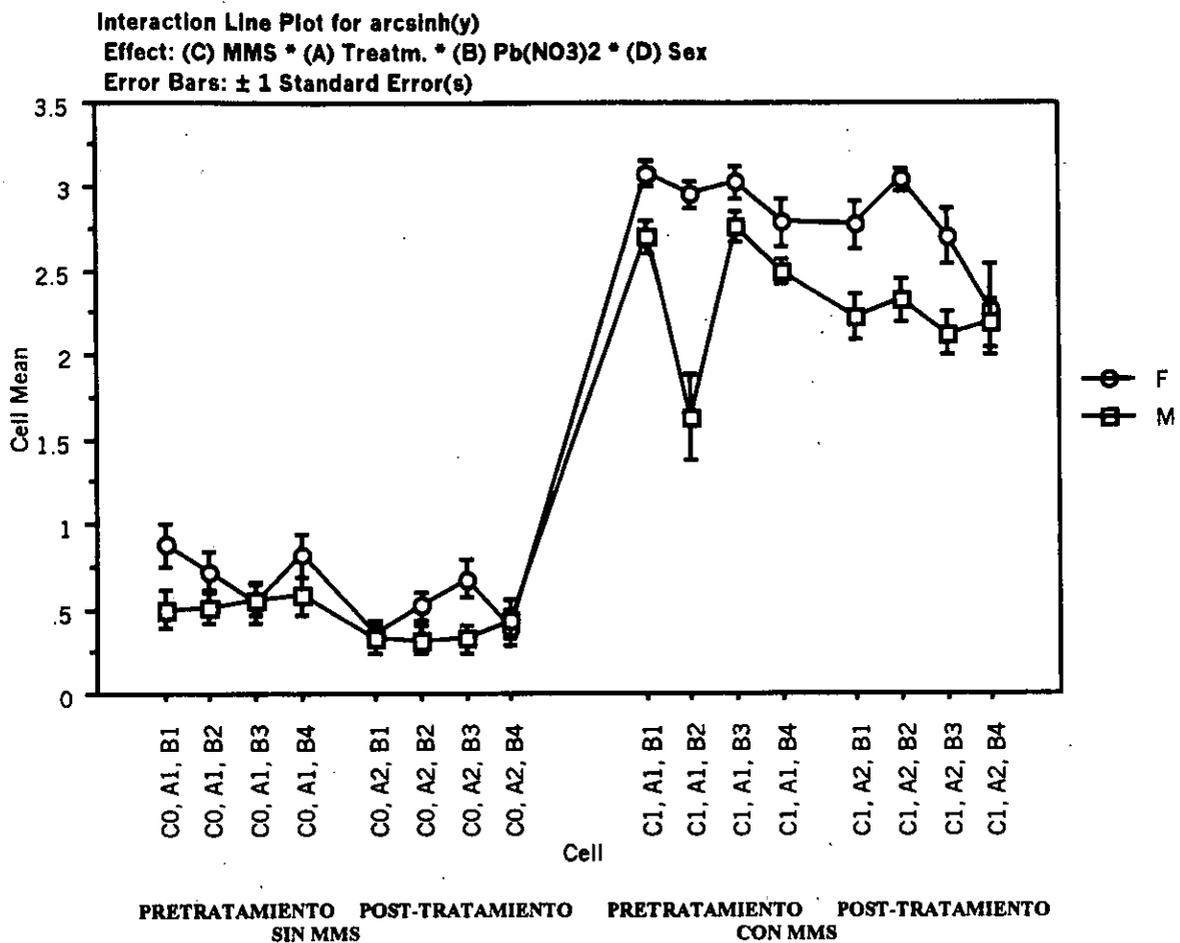


Fig. 3.78. Interacciones de los promedios o medias aritméticas de las manchas totales/individuo(y) en los tratamientos con nitrato de Pb, sin y con MMS. Se excluyeron los testigos con manipulación mínima (c/mm). Los valores son mayores en los pretratamientos y las hembras.

Interpretación de ANOVA factorial de manchas totales/individuo obtenidas con nitrato de Ca (B1 a B4), sin los testigos de manipulación mínima (c/mm B0)

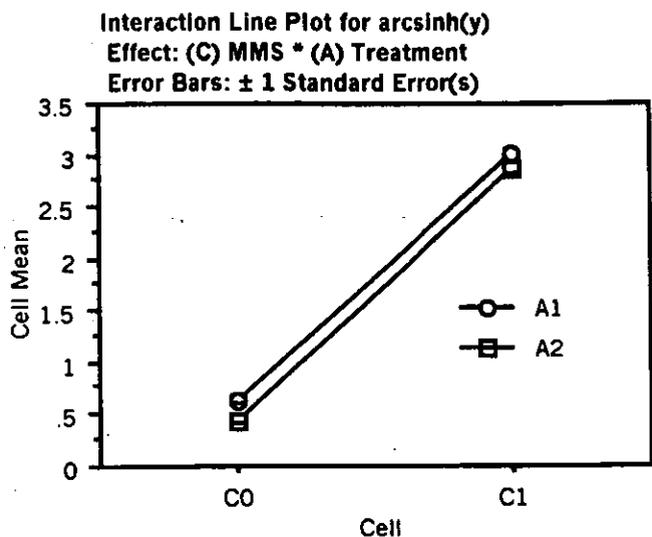


Fig. 3.79-Ca. Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcsenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (A)

Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- Principal efecto altamente significativo: tratamiento con MMS. Las moscas alimentadas con MMS (C1) tienen una frecuencia mucho mayor de manchas que las moscas no alimentadas con MMS (C0).
- Efecto significativo: Tratamiento. La unión de todos los datos muestra que el pretratamiento (A1) produjo mucho más manchas que el post-tratamiento (A2)
- Las líneas son casi paralelas: por lo tanto la interacción MMS * Tratamiento no es significativa

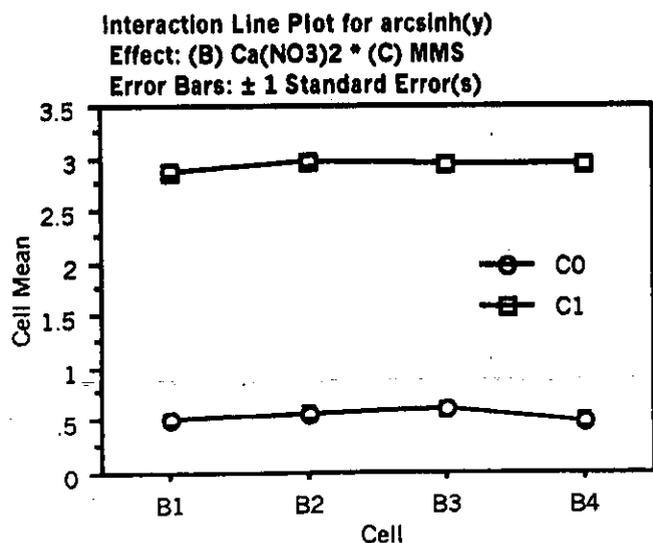


Fig. 3.80-Ca. Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcsenoh(y)

Efecto: (B) Ca(NO₃)₂ * (C) MMS

Barra: ± 1 error estándar

- Efectos no significativos: las concentraciones de nitrato de Ca (B1 a B4). Las líneas son casi horizontales tanto para las moscas alimentadas con MMS (C1) como para las alimentadas sin MMS (C0) en todos los niveles de exposición al nitrato de Ca, desde 0 mM (B1) hasta 1 mM (B4)
- Las líneas para los niveles C0 y C1 son casi paralelas: entonces la interacción MMS * nitrato de Ca no es significativa

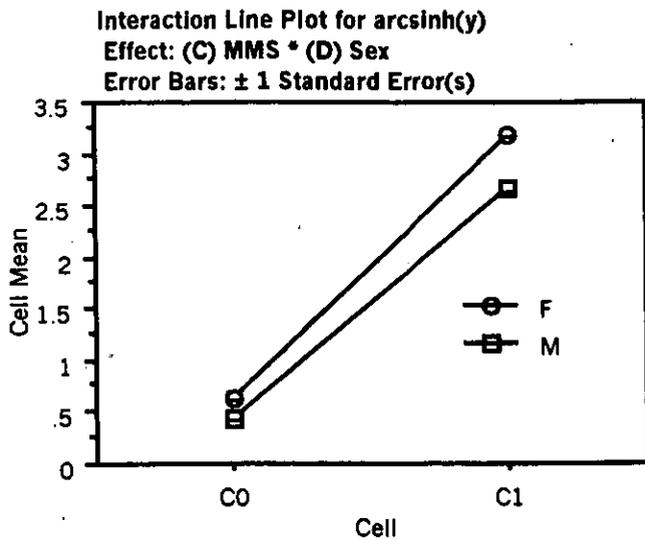


Fig. 3.81-Ca. Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (D) Sexo

Barra: ± 1 error estándar

- Efecto significativo principal: Sexo.
En general las hembras (F) tienen mayor frecuencia de manchas que los machos (M), ya sea alimentadas con MMS (C1) o sin MMS (C0)
- La diferencia entre los sexos es más pronunciada entre las moscas alimentadas con MMS (C1) que sin MMS (C0) como lo muestran las pendientes de las líneas: entonces la interacción MMS * Sexo es significativa

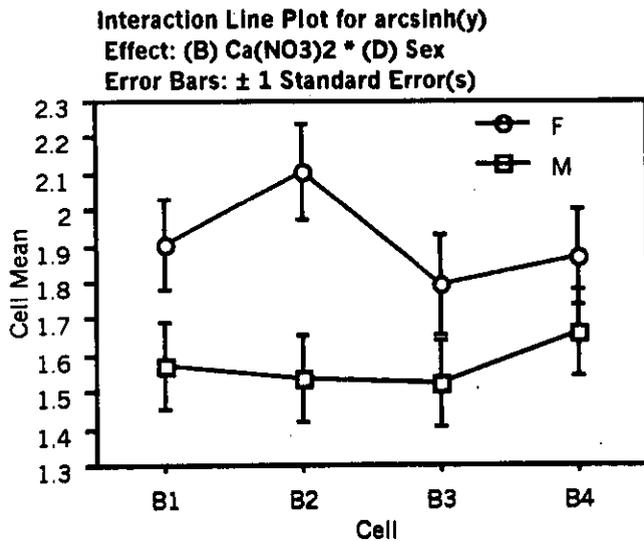


Fig. 3.82-Ca. Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (B) Ca(NO3)2 * (D) Sexo

Barra: ± 1 error estándar

- Mientras que el factor nitrato de Ca (B1 a B4) no es significativo por sí mismo (véase arriba Fig. 2-Ca), la interacción Sexo * nitrato de Ca sí lo es. Esto parece deberse a una tendencia general para una variabilidad mayor en la obtención de manchas entre las hembras (F) si las comparamos con los machos (M) en los diferentes niveles B1 a B4, independientemente de que hayan sido alimentadas con MMS o no. Sin embargo no hay una dependencia sistemática a la dosis en los niveles de Ca, desde 0 mM (B1) hasta 1 mM (B4) lo cual es evidente en las líneas de esta gráfica.

Interaction Line Plot for arcsinh(y)
 Effect: (C) MMS * (D) Sex * (A) Treatment
 Error Bars: ± 1 Standard Error(s)

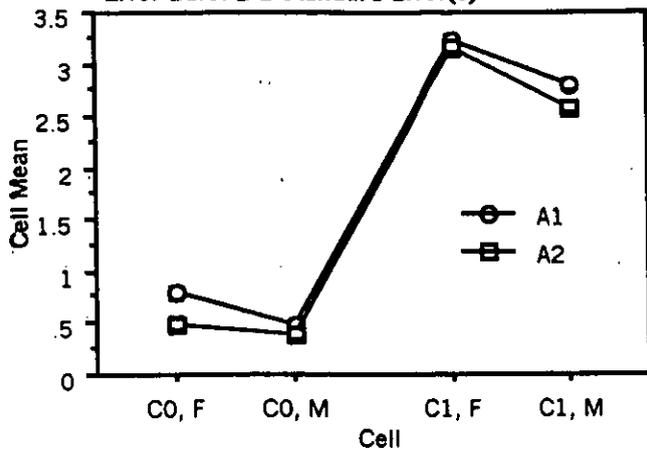


Fig. 3.83-Ca Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (D) Sexo * (A) Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- La interacción MMS * Sexo * Tratamiento es significativa.
- Como ya se ha mencionado, los pretratamientos (A1) generaron frecuencias un poco mayores que los post-tratamientos (A2). La interacción es significativa, porque entre las moscas no alimentadas con MMS (C0) este efecto fue más pronunciado entre las hembras (F), mientras que en las moscas alimentadas con MMS (C1), la diferencia entre los tratamientos es en los machos (M).

Interaction Line Plot for arcsinh(y)
 Effect: (C) MMS * (B) Ca(NO3)2 * (A) Treatment
 Error Bars: ± 1 Standard Error(s)

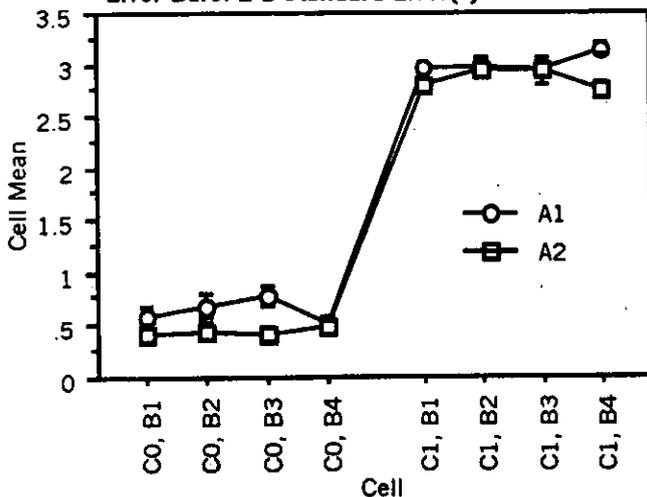


Fig. 3.84-Ca. Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (B) Ca(NO3)2 * (A) Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- Similarmente la interacción MMS * Tratamiento * nitrato de Ca es significativa. Se observa la tendencia a un número mayor de la frecuencia de manchas en el pre-tratamiento (A1) comparándola con el post-tratamiento (A2). La interacción fue significativa, porque la diferencia no fue siempre igualmente pronunciada. Esta fue expresada a diferentes niveles de nitrato de Ca (B1-B3, 0 mM - 0.5 mM) entre las moscas no alimentadas con MMS (C0) en comparación con las moscas alimentadas con MMS (C1) donde se muestran por arriba solamente dos niveles 0 mM (B1) y 1 mM (B4) de nitrato de Ca.

Interpretación de ANOVA factorial de manchas totales/individuo obtenidas con nitrato de Pb (B1 a B4), sin los testigos de manipulación mínima (c/mm B0)

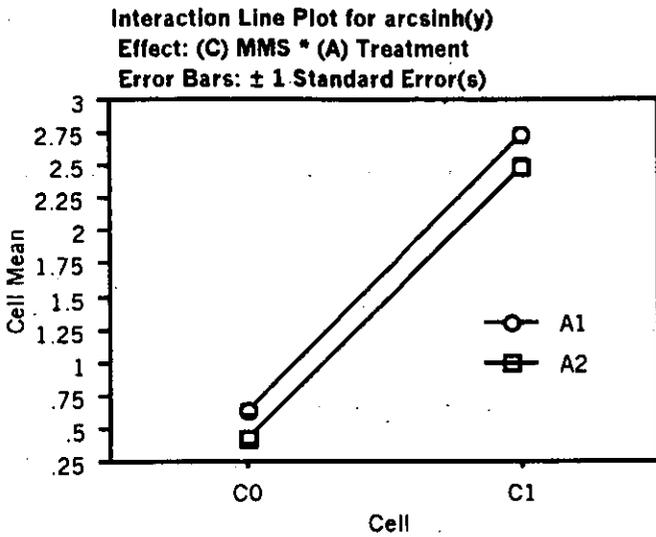


Fig. 3.85-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcsenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (A)

Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- Principal efecto altamente significativo: tratamiento con MMS. Las moscas alimentadas con MMS (C1) tienen una frecuencia mucho mayor de manchas que las moscas no alimentadas con MMS (C0).
- Efecto significativo: Tratamiento. La unión de todos los datos muestra que el pretratamiento (A1) produjo mucho más manchas que el post-tratamiento (A2)
- Las líneas con sus pendientes son casi paralelas: por lo tanto la interacción MMS * Tratamiento no es significativa

Comparación con los experimentos realizados con el nitrato de Ca:

El principal efecto altamente significativo se presentó en los factores: MMS y Tratamiento. De igual manera no hubo interacción y se obtuvo una gráfica muy similar (Fig. 3.79-Ca). Sin embargo, la inducción de manchas por MMS fue algo superior con el nitrato de Ca.

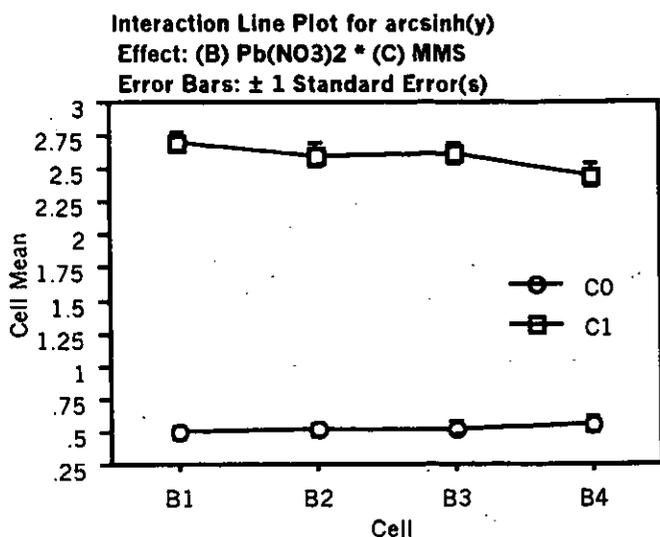


Fig. 3.86-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (B) Pb(NO₃)₂ * (C) MMS
Barra: ± 1 error estándar

- Efectos no significativos:
las concentraciones de nitrato de Pb.
- Las líneas son casi horizontales tanto para las moscas alimentadas con MMS (C1) como para las no alimentadas con MMS (C0), en todos los niveles de exposición al nitrato de Pb, desde 0 mM (B1) hasta 1 mM (B4)
- Sin embargo hay una ligera disminución en un grupo de medias aritméticas de las moscas tratadas con MMS (C1), desde el testigo para el nitrato de Pb 0 mM (B1) hasta la concentración más alta 1 mM (B4): por lo que la interacción MMS * nitrato de Pb es significativa.

Comparación con los experimentos realizados con el nitrato de Ca

Se encontró un trazo semejante al obtenido con el nitrato de Ca, pero la interacción concentración de nitrato de Ca * MMS no fue significativa (Fig. 3.80-Ca). En todos los niveles del factor nitrato de Ca se encontraron frecuencias de manchas muy uniformes entre los grupos de moscas alimentadas sin MMS, así como en los grupos de moscas alimentadas con MMS.

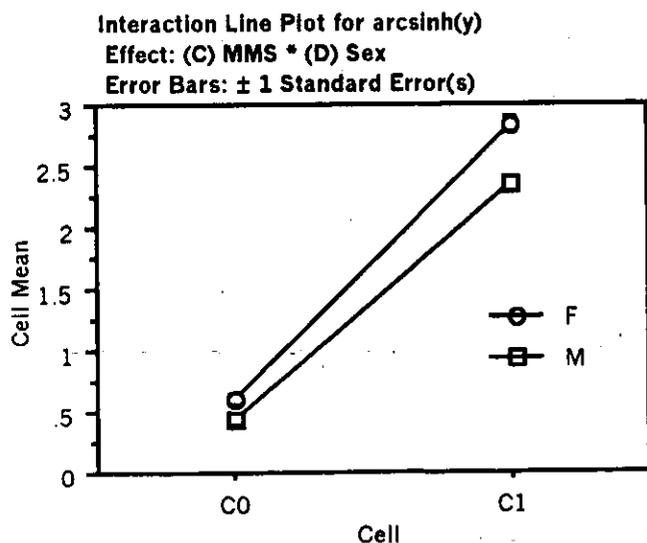


Fig. 3.87-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (D) Sexo
Barra: ± 1 error estándar

- Efecto significativo principal:
Sexo. Las hembras (F) tienen en general mayor frecuencia de manchas que los machos (M), ya sea que hayan sido alimentadas con MMS (C1) o sin MMS (C0)
- La diferencia entre los sexos es más pronunciada entre las moscas alimentadas con MMS (C1) que entre las moscas alimentadas sin MMS (C0) como se muestra por las pendientes de las líneas, por lo que la interacción MMS * Sexo es significativa

Comparación con los experimentos realizados con el nitrato de Ca:

El efecto significativo principal es el mismo: Sexo. Hubo interacción significativa entre MMS * Sexo, por lo tanto la gráfica obtenida con el nitrato de Ca (Fig. 3.81-Ca) es muy similar a ésta.

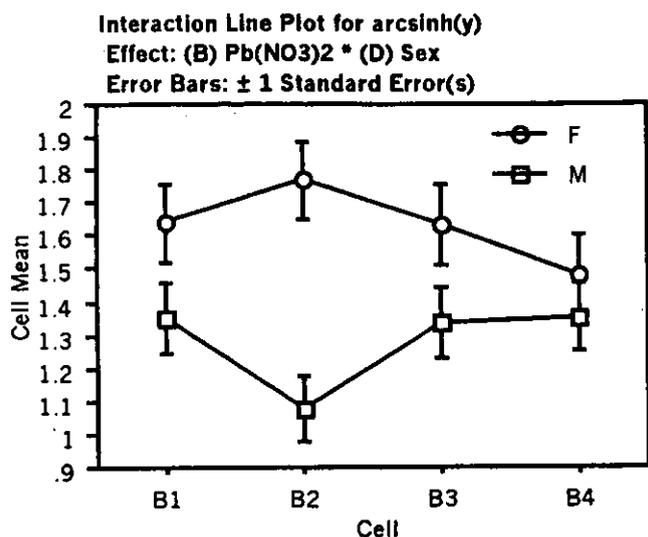


Fig. 3.88-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (B) Pb(NO3)2 * (D) Sexo
Barra: ± 1 error estándar

- Mientras que el principal efecto del nitrato de Pb (B1-B4) no es significativo por sí mismo, la interacción Sexo * nitrato de Pb es significativa como se muestra con las líneas trazadas para las hembras (F) y machos (M). Esto parece deberse a una tendencia general para mayor variabilidad en la recuperación de manchas entre ambos sexos a diferentes niveles B1-B4 (especialmente a B1 = 0.1 mM), hayan sido alimentados con MMS o no. La ausencia de una dependencia sistemática de la concentración en los niveles de nitrato Pb de 0 mM (B1) a 1 mM (B4) es evidente en las líneas de esta gráfica de interacción

Comparación con los experimentos realizados con el nitrato de Ca:

Se ha visto que el principal efecto de la concentración de sales metálicas con el nitrato de Ca, tampoco fue significativo (Fig. 3.80-Ca). Hay interacción significativa nitrato de Ca * Sexo (Fig. 3.82-Ca). Sin embargo la gráfica obtenida fue diferente, porque no contribuyen los mismos grupos a la variabilidad (asistemática y difícil de explicar) en los diferentes niveles de sales metálicas y Sexo.

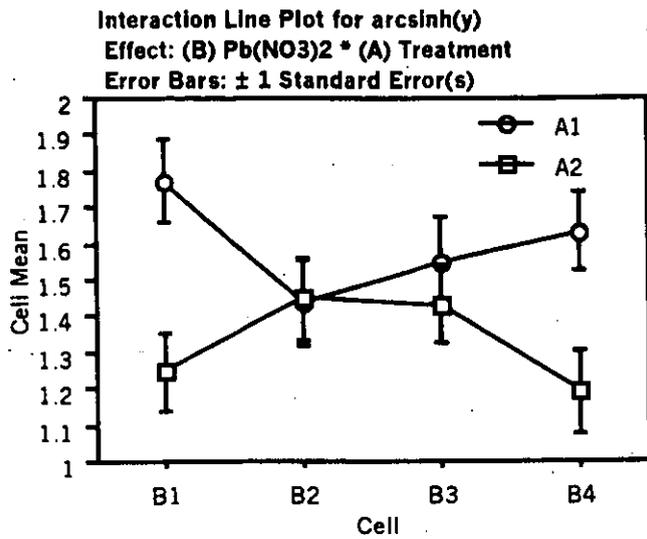


Fig. 3.89-Pb. Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcsenoh(y).

Efecto: (B) Pb(NO₃)₂ * (A) Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

Barra: ± 1 error estándar

- De la misma manera las líneas separadas del pretratamiento (A1) y post-tratamiento (A2) muestran la interacción significativa del nitrato de Pb * Tratamiento, pero es evidente que no hay una dependencia sistemática de la concentración desde 0 mM (B1) hasta 1 mM (B4).

La interacción se debe a resultados divergentes de las moscas pre-tratadas (A1) y post-tratadas (A2) con 0 mM de nitrato de Pb (B1) y la concentración mayor de 1 mM (B4) al contrario que en los niveles intermedios de 0.1 (B2) y 0.5 mM (B3).

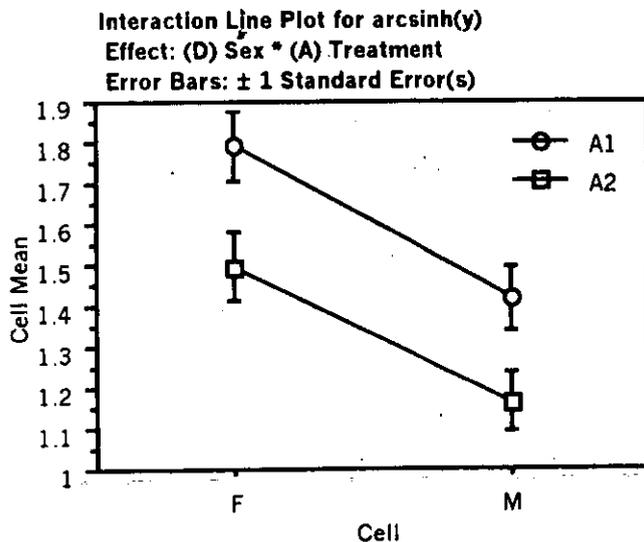


Fig. 3.90-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcsenoh(y).

Efecto: (D) Sexo * (A) Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- Como se muestra arriba (Fig. 3.85-Pb) el principal efecto Tratamiento fue significativo, porque los datos acumulados de los grupos de moscas pretratadas (A1) tienen más manchas que las moscas post-tratadas (A2).
- Sobre todo, las hembras tienen más manchas que los machos. Esto es lo que da un efecto principal Sexo.
- Las líneas paralelas de esta figura muestran que en todos los datos acumulados, la interacción Sexo * Tratamiento no es significativa

Interaction Line Plot for arcsinh(y)
 Effect: (D) Sex * (B) Pb(NO3)2 * (A) Treatment
 Error Bars: ± 1 Standard Error(s)

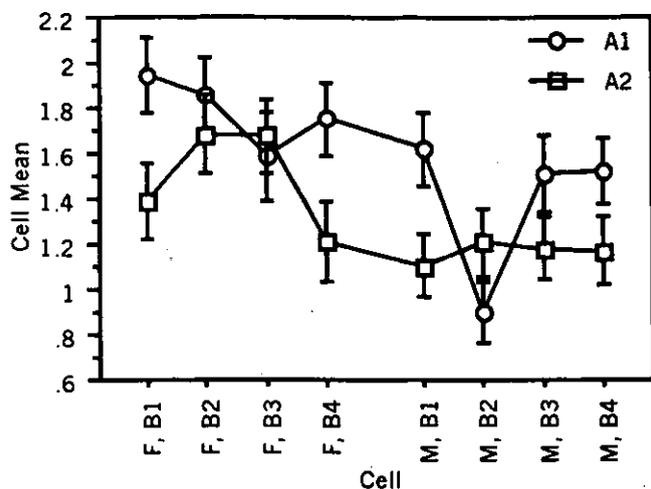


Fig.3.91-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcsenoh(y).

Efecto: (D) Sexo * (B) Pb(NO3)2 * (A) Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- La gráfica cambia cuando los datos son analizados en detalle para los diferentes niveles (B1-B4) de nitrato de Pb. Hay una interacción de segundo orden entre Sexo * nitrato de Pb * Tratamiento. Entre hembras, se observa la diferencia en los niveles B1 y B4 que explican la significancia Sexo y Tratamiento (Fig.3.90-Pb). Entre los grupos de machos, se comporta diferente debido a la obtención excepcionalmente baja de manchas en las moscas pre-tratadas (A1) del nitrato de Pb 0.1 mM (B2). No hay explicación aparente para estas diferencias entre los sexos, ni tampoco para la falta de dependencia sistemática de las concentraciones del nitrato de Pb (B1-B4).

Comparación con los experimentos realizados con el nitrato de Ca:

Las interacciones análogas a las ilustradas en para el nitrato de Pb en las Figs. 3.88-Pb a 3.91-Pb no fueron significativas en los experimentos realizados con el nitrato de Ca, por lo cual no se presentan. Esto contrasta con los experimentos con nitrato de Pb. Definitivamente con el nitrato de Pb los resultados son más asistemáticos y difíciles de explicar, por lo que ANOVA resulta compleja y poco fácil de interpretar.

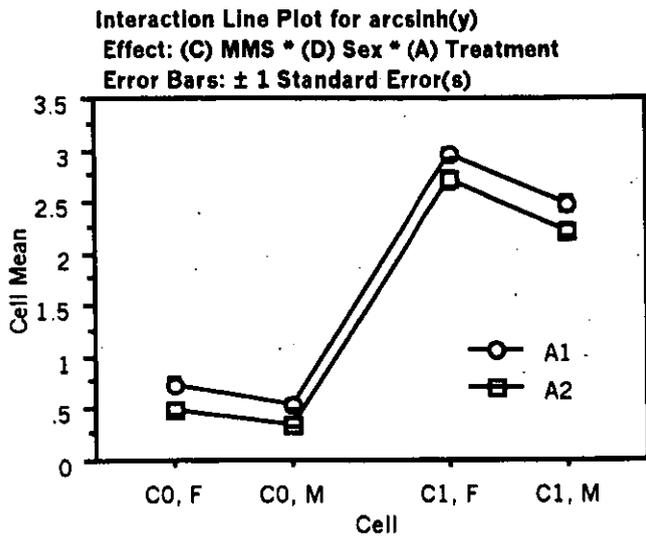


Fig. 3.92-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcosenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (D) Sexo * (A) Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- La interacción MMS * Sexo * Tratamiento no es significativa como se muestra en las líneas casi paralelas. Como ya se ha mostrado (Fig. 3.85-Pb), los pretratamientos (A1) produjeron mayores frecuencias de manchas que en los post-tratamientos (A2). La interacción no es significativa porque entre las moscas no alimentadas con MMS (C0) o alimentadas con MMS (C1), la respuesta al tratamiento fue semejante entre los dos sexos, a pesar de que las hembras tienen más manchas, especialmente en las moscas tratadas con MMS (Fig. 3.87-Pb).

Comparación con los experimentos realizados con el nitrato de Ca:

La interacción MMS * Sex * Tratamiento es la única interacción que fue significativa con nitrato de Ca (Fig. 3.83-Ca), pero no lo fue con el nitrato de Pb. No hay explicación satisfactoria para la significancia comentada. Así como se muestra ausencia de significancia con el nitrato de Pb, la interacción numéricamente significativa con nitrato de Ca puede ser considerada más bien casual que causal.

Interaction Line Plot for arcsinh(y)
 Effect: (C) MMS * (B) Pb(NO₃)₂ * (A) Treatment
 Error Bars: ± 1 Standard Error(s)

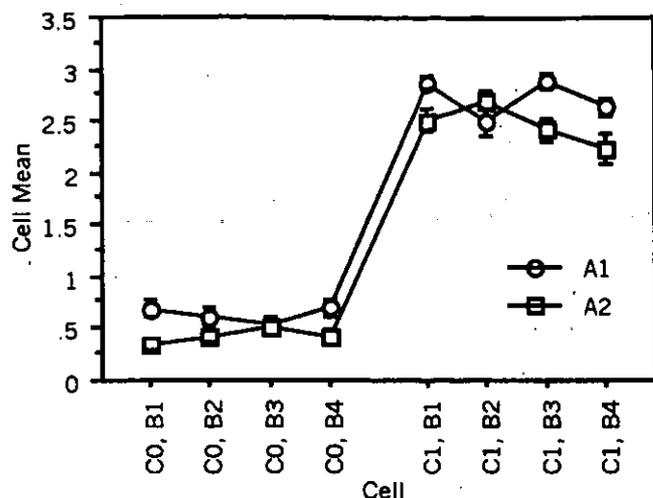


Fig. 3.93-Pb Interacción para los promedios o medias aritméticas de arcsenoh(y).

Efecto: (C) MMS * (B) Pb(NO₃)₂ * (A) Tratamiento

Barra: ± 1 error estándar

- La interacción MMS * Tratamiento * nitrato de Pb es significativa. La tendencia para obtener mayor frecuencia en el pretratamiento (A1) en oposición al post-tratamiento (A2) se muestra en esta gráfica. La interacción es significativa porque la diferencia no fue siempre igualmente pronunciada. Esto no se expresa con nitrato de Pb 0.5 mM (B3) en moscas sin MMS (C0). Sucede algo semejante en moscas alimentadas con MMS y nitrato de Pb 0.1 mM (B2). No existe explicación posible para las diferencias numéricas en algunos niveles B.

Parece que la ligera tendencia de disminución del nivel B1 (0 mM) al nivel B4 (1 mM) en moscas alimentadas con MMS y tratadas con nitrato de Pb (Fig. 3.86-Pb arriba) podría resultar de reunir datos dispares de los pretratamientos y post-tratamientos. Al menos para los pretratamientos (A1) esta tendencia no existe. En los post-tratamientos (A2), no se puede probar lo anterior. Al realizar las comparaciones detalladas entre dos muestras con la prueba de U para el factor Pb de los grupos post-tratados con diferentes niveles de este nitrato y su correspondiente testigo paralelo 0 mM (B1) el efecto no fue significativo (véase APÉNDICE, Tabla 3.12, última sección, Post-tratamientos MMS-Pb). Esto es un argumento fuerte en contra de dicha tendencia.

Comparación con los experimentos realizados con el nitrato de Ca:

Una interacción significativa entre MMS * Sales metálicas * Tratamiento también caracteriza al protocolo con Ca. Sin embargo el patrón de variabilidad entre sus grupos fue diferente (Fig. 3.84-Ca). En ambos casos, con el nitrato de Ca así como con el de Pb, las causas para la falta de datos sistemáticos y una variabilidad compleja entre los grupos es indeterminada.

Conclusiones generales del análisis con ANOVA sin testigos de manipulación mínima (B0)

Los resultados de ANOVAs hacen la interpretación difícil. Sin embargo el resultado principal de ambos protocolos (nitrato de Ca y nitrato de Pb) es que no se encontró un efecto principal de las concentraciones de sales metálicas que se reflejara en una correlación o en un efecto verdaderamente sistemático con las concentraciones de sales metálicas. Particularmente, las interacciones significativas entre MMS * Sales metálicas * Tratamiento no deberían ser sobreinterpretadas.

3.7.2. Interpretación de ANOVA factorial de manchas totales/ individuo obtenidas entre los testigos de manipulación mínima (B0) y los testigos paralelos (B1)

En este trabajo se ha demostrado que la alimentación con MMS causa un aumento de manchas en las hembras. También se ha establecido que estos valores son superiores en los pretratamientos (A1) al contrario que en los post-tratamientos (A2). También se ha explicado que en los post-tratamientos no hay diferencias entre B0 y B1. Se propuso que las diferencias podían derivar de la manipulación de las larvas en los testigos paralelos de los pretratamientos (C0,A1,B1 y C1,A1,B1).

Con el objeto de conocer si efectivamente la manipulación de los testigos paralelos causó las diferencias con los testigos de manipulación mínima (c/mm B0), se hizo por separado el ANOVA factorial de los datos de los testigos agua (C0, B0 y B1) y 12 mM MMS (C1, B0 y B1). Los resultados son los siguientes:

1. La única diferencia consistente entre los testigos de manipulación mínima (B0) y los paralelos (B1), de las dos series de experimentos que buscaban demostrar el efecto del Ca y del Pb, se encontró entre las moscas pretratadas (A1) (Fig. 3.94). Esta diferencia fue causada por:

1. Un aumento en el número de manchas en los machos de los testigos paralelos alimentados con MMS (véase A1,C1,M,Ca,B1 y A1,C1,M,Pb,B1 en la gráfica de distribución (Fig. 3.95) al contrario de lo obtenido en los testigos con manipulación mínima (B0)

2. Un aumento del número de manchas en las hembras de los testigos paralelos alimentadas sin MMS (véase A1,C0,F,Ca,B1 y A1,C0,F,Pb,B1 en la gráfica Fig.3.95 al contrario de lo obtenido en los testigos con manipulación mínima.

En los resultados de ANOVA, para estos datos transformadas en arcosenoh (APÉNDICE, Tabla 3.26) se obtuvieron los siguientes resultados:

- Un efecto principal significativo del factor (B) Manipulación ($p=0.0050$) indicando una tendencia general de aumento de la frecuencia entre los testigos paralelos, si todos los datos son acumulados.
- Una interacción de primer orden entre (A) Tratamiento * (B) Manipulación ($p=0.0013$), donde la diferencia está en los pretratamientos (A1) y no en los post-tratamientos (A2).
- Una interacción de segundo orden entre (B) Manipulación * (C) MMS * (D) Sex ($p=0.0017$), porque los efectos son evidentes en los sexos opuestos, dependiendo si el tratamiento fue con agua (C0) o con MMS (C1).

Todas las interacciones con el factor (B) Manipulación no fueron significativas con ANOVA de cinco vías ($p>0.05$). En las series experimentales con el factor (Ca,Pb) no hay efecto significativo principal, ni interacciones significativas, porque en todos los testigos analizados en esta sección la concentración de nitratos es de 0 mM.

Interacción de los datos transformados en arcoseno(y) para testigos con manipulación mínima (B0) y paralelos (B1)
Efecto: (A) Tratamiento * (C) MMS * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series * (B) Manipulación
Barras: ± 1 Error estándar

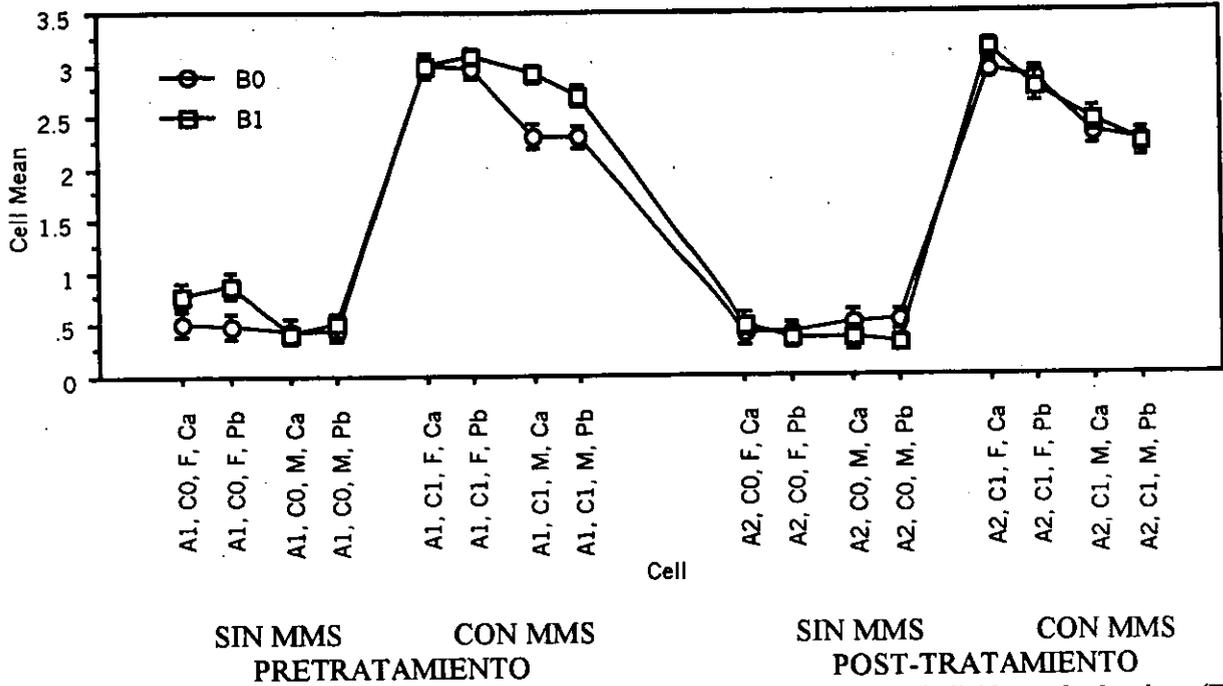


Fig. 3.94. La interacción de los promedios o medias aritméticas de las manchas totales/individuo en las hembras (F) y machos (M) en los testigos con manipulación mínima (B0) y paralelos (B1) comprobó que la diferencia reside en el pretratamiento (A1). En el post-tratamiento no hay diferencias.

Factores. (A) Tratamiento, (C) MMS, (D) Sexo, (Ca,Pb) Series, (B) Manipulación

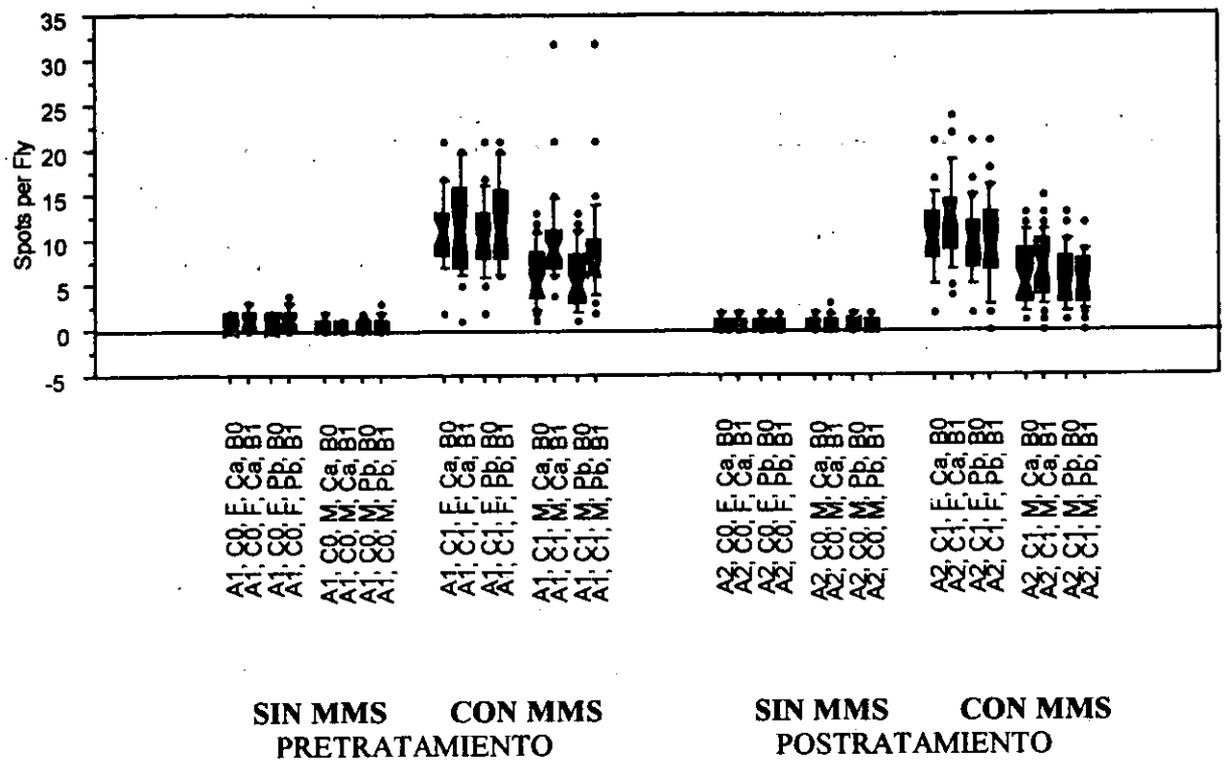


Fig. 3.95. Distribución de los individuos con manchas totales de los testigos con manipulación mínima (B0) y paralelos (B1). En los paralelos las diferencias residen en el pretratamiento, donde las hembras sin MMS y los machos con MMS tienen más manchas.

4. DISCUSIÓN

4.1. Efectos del MMS

Frecuencia de las manchas

En ausencia de MMS, los resultados de SMART mostraron que la frecuencia de manchas fue mayor para pequeñas, después grandes y gemelas, lo que concuerda con lo esperado cuando no hay efecto genotóxico (Graf, 1995).

El tratamiento agudo con MMS (12 mM) de las 72 a 74 h de edad larvaria en las series de tratamientos y el crónico en el testigo positivo con 1.2 mM de las 72 a las 120 h, produjo diferencias significativas con cantidades mayores de grandes, después de gemelas y de pequeñas. La distribución asimétrica de las manchas totales/individuo(y) fue como se esperaba para un compuesto genotóxico como el MMS (Frei y Würzler, 1995) en comparación con la distribución de Poisson que se obtiene con el disolvente, en este caso agua bidestilada o cuando no hay efecto genotóxico. Lo anterior concuerda con datos previos obtenidos con esta prueba, para evaluar el efecto del MMS (Graf, 1995).

*Tamaño de los clones *mwh* y distribución*

En todas las series de tratamientos con y sin MMS y en los testigos positivos MMS y uretano, el tamaño de los clones *mwh* y su distribución, coincidió con lo previamente descrito para larvas alimentadas o no con MMS (Graf, 1995).

Manchas gemelas

Las series pretratadas a las 48 h con sacarosa al 3% y levadura seca en polvo, con o sin iones metálicos, mostraron baja frecuencia de manchas gemelas y variaciones heterogéneas en la frecuencia en los dos sexos. Cuando estas series se trataron con MMS (12 mM) por 2 h, aumentaron las diferencias entre ambos sexos en todos los casos. En los post-tratamientos las diferencias entre las hembras y los machos fueron menores. Sin embargo, no se hizo ANOVA factorial o alguna otra prueba estadística para estos datos, por lo que las diferencias no fueron comprobadas en forma estadística.

El tratamiento crónico con MMS (1.2 mM) hizo que la frecuencia de manchas gemelas se incrementara, pero no se observó la aparente diferencia entre los sexos. En estos testigos positivos, el efecto de MMS no produjo esta diferencia. Con el testigo positivo uretano sólo la exposición mayor (20 mM) causó diferencias en las frecuencias de manchas gemelas entre hembras y machos. Es conveniente analizar de manera estadística estas diferencias para comprobar si se requieren ciertas condiciones como concentración (20 mM de uretano y 12 mM de MMS) o la interacción entre determinados factores Tratamiento * MMS), para inducir diferencias significativas en los procesos de recombinación entre homólogos que se manifiestan en las diferencias de las frecuencias de las manchas gemelas entre los sexos.

4.2. Efectos del sexo

En la prueba del ala se ha demostrado que aún en la muestra testigo existe una sobredispersión debida a que las hembras tienen más manchas que los machos (Frei y Würzler, 1995). Sin embargo para contender con esto se mantuvieron constantes las proporciones de hembras y machos al acumular los datos de los dos experimentos independientes para cada serie de tratamientos. En este trabajo las hembras alimentadas con MMS presentaron una cantidad significativamente mayor de manchas totales que los

machos, pero también en los pretratamientos sin MMS que fueron manipulados (B1=0 mM). En los post-tratamientos, con ambos iones y sin MMS, no se observó esta diferencia significativa, aunque hay cierta tendencia al aumento de manchas en las hembras. En los testigos positivos MMS (1.2 mM) y uretano (20 mM) se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de manchas totales entre hembras y machos. La distribución asimétrica de las manchas totales / individuo (y) en hembras, tendiente hacia la derecha, fue mayor en las series con MMS. La prueba no paramétrica de U, menos exigente con respecto a la distribución, confirmó los resultados de ANOVA y la corrección de Bonferroni-Dunn para ANOVA, para el factor Sexo.

Las diferencias entre la frecuencia de manchas totales entre hembras y machos, podría ser explicada si se comprobara que existe en alguna de las líneas utilizadas para estos experimentos un elemento sensible al MMS y a la manipulación de las larvas de 48 h de edad. La presencia de un elemento de este tipo, podría incidir en el aumento significativo del daño en las hembras con respecto al daño en los machos, bajo ciertas condiciones de tratamiento.

4.3. Efectos de los tratamientos

Los pretratamientos se realizaron en presencia de levadura seca pulverizada y una solución de sacarosa al 3% (B1) 0 mM o soluciones de la sal metálica (B2) 0.1, (B3) 0.5 y (B4) 1 mM en sacarosa al 3%, de las 48 a las 72 h de edad. Los resultados mostraron incremento en la frecuencia de manchas totales/individuo(y) de los testigos (B1) 0 mM ó (B1) MMS 12 mM, en contraste con los que se manipularon mínimamente a esa edad (B0) 0 mM s/m, con o sin 12 mM de MMS. La levadura y la sacarosa se utilizaron como fuente de alimento para las larvas, con el fin de asegurar su desarrollo, impedir un retraso y una variación en la frecuencia de manchas que podría deberse a una edad menor a la calculada (Graf, 1995). Si la manipulación de las larvas con el pretratamiento las hubiera dañado impidiéndoles por ejemplo, ingerir adecuadamente, se habría retrasado su desarrollo. Lo anterior hubiera causado en los pretratamientos, con MMS a las 72 h, una frecuencia de manchas menor y de tamaño más grande, que en los post-tratamientos y los testigos de manipulación mínima (B0) 0mM c/mm con MMS. Debido a que se ha comprobado que a menor edad larvaria, menor es la frecuencia de manchas y su tamaño es mayor. Esta posibilidad se desecha porque se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos, con una cantidad más elevada de manchas en los pretratamientos. Por otra parte, no se evidencian diferencias aparentes en el tamaño de los clones *mwh* entre los dos tratamientos.

En los post-tratamientos no se detectaron diferencias significativas, entre los testigos (B0) 0 mM s/m y (B1) 0 mM con y sin MMS, porque el tratamiento fue idéntico.

En los testigos positivos MMS 1.2 mM y uretano 5, 10 y 20 mM, las larvas sólo fueron manipuladas a las 72 h de edad para separarlas del medio y añadirlas al medio instantáneo. Por lo anterior es que fueron manipuladas aún menos que en los post-tratamientos y no se alimentaron con sacarosa al 3% y levadura seca como en los pretratamientos.

La manipulación de larvas a las 48 h de edad tuvo un efecto en casi todas las series de pretratamientos: las frecuencias de manchas totales y las diferencias en las hembras, fueron mayores que en los post-tratamientos, en ausencia o en presencia de MMS.

Una explicación tentativa a estos eventos podría ser que algún producto del metabolismo de las levaduras, como el H_2O_2 , penetrara hasta la membrana nuclear y reaccionara con los iones

de Fe o Cu para formar radicales libres (*ROS*) (Friedberg *et al.*, 1995). Sin embargo, la colecta de huevos se hizo en todos los casos en una base de levaduras más azúcar, por lo que las larvas de los post-tratamientos y de (B0) 0 mM c/mm, también estuvieron en contacto con levaduras activas. La diferencia en los pretratamientos radica en la manipulación de las larvas a las 48 h y una exposición mayor al aire a esa edad. Esto podría haber aumentado la exposición de las larvas a radicales libres (*ROS*) y ya se ha mencionado el efecto que éstos tienen sobre el residuo de azúcar del ADN y las bases produciendo lesiones. La mayoría de estas lesiones producen rompimientos de una sola hebra (*SSBs*) y son reparadas por escisión de bases (*BER*) (Horváthová *et al.*, 1998).

Si se asume la presencia de al menos una enzima a las 72 h de edad, capaz de reparar cualquier tipo de daño derivado del estrés oxidante y/o alquilante derivado de los tratamientos sin y con MMS, habría diferencias significativas entre los post-tratamientos y los pretratamientos, lo cual se cumplió. Para explicar lo anterior se requeriría que faltara un componente a las 48-72 h de edad (segundo estadio), que estuviera involucrado en los mecanismos de reparación del daño en el ADN. Este componente podría ser una enzima que participara en la reparación por escisión de bases (*BER*), como una glucosilasa o por una transferasa de la reparación directa de daños por alquilantes y además en la reparación de los daños por estrés oxidante. En apoyo a lo anterior encontramos que en *Drosophila* sólo se ha detectado actividad semejante a la uracil-ADN-glicosilasa en larvas de tercer estadio (Deutsch, 1995). Además se ha reportado que en el segundo estadio está ausente la O⁶-MGT II, que en *Drosophila* es capaz de aceptar metilos de los residuos de N7-MeG, N3-MeA y O⁶-MeG y transferirlos a la cisteína de la transferasa (Dusenbery y Smith, 1996).

Una enzima que tiene participación en los procesos de reparación por actividad liasa AP, de los daños provocados por agentes alquilantes, estrés oxidante, recombinación de homólogos (*HRR*) y que es dependiente de Mn²⁺, es la proteína I para reparación por recombinación codificada por el gen *RrpI*.

La hipersensibilidad al MMS, al tratamiento oxidante, el aumento de manchas gemelas en hembras en un mecanismo aparentemente dependiente de la concentración del mutágeno, la heterogeneidad observada en las moscas alimentadas con MMS y los cationes divalentes, son varios eventos que pueden tener múltiples orígenes. Todos ellos coinciden con las funciones del gen *RrpI* localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 2. Sin embargo no se conocen mutantes de este gen en *Drosophila melanogaster* y la identificación del gen o los genes que intervinieron en los resultados de estos ensayos van más allá de los alcances de este ensayo a plazo corto y de los objetivos que se plantearon en este trabajo. Graf y colaboradores (1990) introdujeron el mutante *mei-9LI* deficiente en la reparación por escisión, en la prueba del ala. Sus resultados mostraron aumento de 4 a 5 veces del daño, pero sólo hubo manchas pequeñas. Como en este trabajo se obtuvieron los tres tipos de manchas, podemos afirmar que se desecha la presencia de este mutante en la cruce estándar utilizada.

4.4. Efectos del Ca²⁺ y del Pb²⁺

Los objetivos de esta investigación fueron comprobar la presencia o ausencia de genotoxicidad del Ca²⁺ y del Pb²⁺ y/o demostrar el efecto modulador del Ca²⁺ y Pb²⁺ sobre la acción genotóxica del MMS. Se obtuvieron variaciones entre los grupos que arrojaron algunas interacciones significativas de primer y segundo orden, difíciles de interpretar. Por otra parte no se encontró una causa sistemática para esas variaciones. Por lo tanto los resultados obtenidos para estos iones se discuten a continuación:

Nitrato de calcio

Como se mostró en las secciones precedentes, el efecto genotóxico del calcio se ha relacionado con el estrés oxidante. En sistemas en los que se ha alterado el metabolismo del calcio, este metal produce especies reactivas de oxígeno (ROS) como el H_2O_2 y el $\cdot OH$ que dañan al ADN y producen al mismo tiempo aumento del Ca^{2+} citosólico, por entrada del ión y liberación de las reservas internas. Korzets *et al.* (1999) demostraron que el aumento de Ca^{2+} inhibe la reparación que depende de una tirosina-cinasa dependiente de la concentración del Ca^{2+} (Gafer *et al.*, 1997). Yee-Chien y Haimei (1996) describieron en células de ovario de criceto chino que los agentes que causan estrés oxidante perturban los flujos de calcio citosólicos y/o de los organelos produciendo problemas en las actividades reguladas por el calcio. La reducción de niveles extracelulares del ión Ca^{2+} por debajo de 1.4 mM disminuyeron la frecuencia de micronúcleos provocados por el arsénico en estas células. Lohman y Beyersmann (1993) demostraron que la elevación de los niveles de calcio producen la activación de una endonucleasa dependiente del Ca^{2+} / Mg^{2+} y aumento de radicales libres, lo cual se relaciona con rompimientos en las cadenas del ADN. Estos autores encontraron que en linfocitos humanos dañados con UV, la reparación del ADN tiene un nivel óptimo con $CaCl_2$ 1 mM en el medio. Demostraron que la UV produce aumento del Ca^{2+} citosólico, por mayor entrada del ión y por inhibición de la ATP- Ca^{2+} de la membrana plasmática. Al elevar o reducir el Ca^{2+} celular de la concentración descrita, se inhibe la reparación de cualquier daño en estas células.

En este trabajo y en este sistema de prueba, el factor Ca con o sin el MMS, no mostró ser un factor que causara efectos significativos ya que no hay diferencias sistemáticas en la frecuencia de manchas totales/individuo(y). La ausencia de interacción Ca * MMS elimina la posibilidad de una acción moduladora sobre el daño provocado por el MMS. En las series del Ca^{2+} se notó que cuando los resultados eran significativos con ANOVA, lo eran con la prueba de H (Tablas 3.6 y 3.7) y si no eran significativos con ANOVA, tampoco lo eran con la prueba de H (Tablas 3.4 y 3.5). Como coinciden los resultados entre estas pruebas estadísticas se aceptan esas significancias. Sin embargo estas variaciones no sistemáticas en la respuesta genotóxica, que no pueden ser explicadas, podrían derivar de ciertas variaciones en los niveles intracelulares del Ca^{2+} o de otros factores internos o externos no controlados, que tuvieron efecto sólo en ciertos casos sobre el daño al ADN, en forma de una tendencia al aumento de manchas, pero de forma no sistemática.

Nitrato de plomo

De la misma manera que con el calcio, se conoce que el Pb^{2+} interfiere en numerosos eventos celulares, como en la actividad de la polimerasa (Johnson, 1998), en la reacción de Fenton produciendo radicales libres (Hartwig, 1995; Roy y Rossman 1992), inhibe la síntesis de ADN y ARN *in vitro* (Frenkel y Middleton, 1987). Long y colaboradores (1994) demostraron que el Pb^{2+} libre activa a la cinasa C (PKC) en el rango de 10^{-11} a 10^{-8} M con una $K_{act} = 5.5 \times 10^{-11}$ M, mientras que el Ca^{2+} libre lo hace en el rango de 10^{-8} a 10^{-5} M, con una $K_{act} = 2.56 \times 10^{-7}$ M. Lo anterior explica la activación de la cinasa C a concentraciones del Pb^{2+} por abajo de los nanomoles. El Pb regula indirectamente la reparación, por su interacción con el Ca^{2+} (Hartwig, 1995; Johnson, 1998) y juega un papel sinérgico con otros metales (Gerber *et al.*, 1980). Las evidencias a favor y en contra de su papel genotóxico, sugieren que el acceso del ión a los sistemas de reparación *in vitro* es más fácil y tiene menos variables, que en los

modelos biológicos eucariotas *in vivo* en donde hay factores múltiples del metabolismo del organismo. Las dosis tóxicas de Pb^{2+} tienen un efecto directo sobre el transporte del Ca^{2+} y Pb^{2+} en las membranas celulares debido a que compiten con los canales y la ATP- Ca^{2+} (Simons, 1993), causando efectos indirectos sobre la homeostasis del calcio por interacciones numerosas con los organelos y con las proteínas reguladas por el Ca^{2+} (Pounds, 1984 y Simons, 1993). La intoxicación aguda con plomo particularmente en sistemas que dependen de la movilización del calcio extracelular, produce frecuentemente antagonismo entre ambos metales y aumento de las acciones mediadas por el calcio (Pounds, 1984).

No se encontró un comportamiento de concentración en ninguna de las series tratadas con plomo. Con SMART se detectó una disminución significativa de las manchas totales/individuo(y) en el pretratamiento (B4) 1 mM con 12 mM MMS. El análisis estadístico de (y) con ANOVA factorial, determinó significancia en los machos del pretratamiento con (B2) 0.1 mM y MMS (Tabla 3.11) debida a la baja frecuencia de manchas comparando los resultados con los del testigo (B1) 0 mM. Al contrario que con el Ca^{2+} no hay diferencias entre las medias aritméticas (promedio) de las frecuencias de los testigos (B0) 0 mM s/m y (B1) 0 mM con MMS y las series tratadas con Pb^{2+} y MMS. Todo lo anterior sugiere una tendencia no sistemática a la disminución de manchas por efecto del plomo. Esta tendencia podría ser explicada con base en el antagonismo ya mencionado entre el calcio y el plomo (Pounds, 1984; Simons, 1993).

El Pb^{2+} produjo variación intragrupal, representada por una tendencia a cantidades menores de manchas, que contribuyó de manera importante a la varianza, pero la variación no fue sistemática por lo que se desecha el efecto genotóxico. La ausencia de interacciones $Pb * MMS$ elimina la posibilidad de una modulación de los efectos del MMS. En las series de Pb^{2+} la prueba de H no fue significativa cuando la ANOVA lo fue (APÉNDICE, Tablas 3.11 y 3.12). La diferencia debe ser resultado de irregularidades en la composición de esas muestras, por lo que se acepta la no significancia mostrada en la prueba de H para este factor. Esta aceptación se basa en que en los casos contradictorios, se prefieren a los resultados de las pruebas no paramétricas, porque están basadas en menores requisitos y en la mayoría de los casos son tan eficientes como las paramétricas (Frei, comunicación personal).

4.5. Interacciones de segundo orden

No se presentaron interacciones significativas en las series sin MMS y con sales metálicas. La significancia de las interacciones de segundo orden " $MMS * Ca * Tratamiento$ " y " $MMS * Pb * Tratamiento$ ", motivó el análisis de los factores Ca y Pb en ANOVAS para cada grupo de series (APÉNDICE, Tablas 3.4 a 3.7 y 3.8 a 3.12).

El análisis estadístico de totales/individuo(y) en las series con Ca y MMS mostró que se obtuvieron efectos significantes debido a que las frecuencias de los testigos (B0) 0 mM s/m de los pretratamientos y de los post-tratamientos fueron muy bajas. Las diferencias en ambos tratamientos con MMS se presentaron entre (B0) 0 mM s/m y (B1) 0 mM, (B2) 0.1 mM y (B4) 1 mM del pretratamiento (APÉNDICE, Tabla 3.6) y entre (B0) 0 mM s/m y (B2) 0.1 mM y (B3) 0.5 mM (APÉNDICE, Tabla 3.7). Estas significancias fueron comprobadas para ANOVA con la corrección de Bonferroni-Dunn.

Con el factor Pb hay también diferencias significativas en los grupos tratados con MMS. Estas fueron entre (B1) 0 mM y (B3) 0.5 mM con (B2) 0.1 mM del pretratamiento (Tabla 3.11) y entre (B3) 0.1 mM y (B4) 1 mM del post-tratamiento (Tabla 3.12). Las diferencias fueron comprobadas con el método de Bonferroni-Dunn, pero no con la prueba de H. Estas diferencias no sistemáticas son difíciles de explicar y pueden deberse a factores externos e internos que inciden en los resultados de esta prueba *in vivo*. En contraste con el Ca^{2+} , en las series con Pb^{2+} no se detectaron diferencias con los testigos (B0) 0 mM c/mm. Esto último concuerda con la apreciación de una tendencia no sistemática a la disminución de manchas en las series tratadas con plomo. Las interacciones entre el Ca^{2+} y el Pb^{2+} a nivel intracelular podrían haber provocado estos resultados. El control del experimentador sobre la homeostasis del calcio en un ensayo *in vivo* es algo que está fuera de su alcance. Por lo anterior es que las pequeñas variaciones intracelulares de ambos cationes, podrían haber contribuido a los resultados no sistemáticos que se encontraron en las series de experimentos.

5. CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que

1. En este ensayo se demostró que ninguno de los protocolos de tratamientos (pre y post-tratamiento) mostraron efectos genotóxicos sistemáticos que fueran causados por los nitratos de plomo y de calcio, Las diferencias significativas encontradas en las series con los nitratos no pueden ser explicadas con este ensayo.
2. Se demostró que con ninguno de los protocolos de tratamientos (pre y post-tratamiento) hay efectos sistemáticos moduladores de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción genotóxica del MMS. Las tendencias a un aumento en la cantidad de manchas por el nitrato de Ca o una disminución por el nitrato de Pb fueron heterogéneas y asistemáticas, por lo que no pueden ser explicadas.
3. El tratamiento agudo y el crónico con MMS, confirmaron el efecto genotóxico de este mutágeno en la prueba del ala de SMART.
4. Las diferencias sistemáticas encontradas entre los dos protocolos de tratamientos de las series con nitrato de Ca y de Pb son resultado de un efecto provocado por el pretratamiento a las 48 h de edad larval. Se dedujo que el efecto es resultado de un estrés oxidante que a esa edad larvaria no fue reparado de manera suficiente.
5. Se presentaron en los pretratamientos con y sin MMS, en los post-tratamientos con MMS y en los testigos positivos MMS y uretano, diferencias significativas entre el número de manchas totales de las hembras y los machos. Estas fueron resultado del pretratamiento, de la interacción Tratamiento * MMS y del tratamiento crónico con MMS y uretano (20 mM).
6. Las manchas gemelas, ocurrieron en cantidad mayor en las hembras de los tratamientos con MMS (12 mM) y el tratamiento crónico con uretano (20 mM), por lo que se deduce que se requieren ciertas condiciones para causar ese efecto.

Con el factor Pb hay también diferencias significativas en los grupos tratados con MMS. Estas fueron entre (B1) 0 mM y (B3) 0.5 mM con (B2) 0.1 mM del pretratamiento (Tabla 3.11) y entre (B3) 0.1 mM y (B4) 1 mM del post-tratamiento (Tabla 3.12). Las diferencias fueron comprobadas con el método de Bonferroni-Dunn, pero no con la prueba de H. Estas diferencias no sistemáticas son difíciles de explicar y pueden deberse a factores externos e internos que inciden en los resultados de esta prueba *in vivo*. En contraste con el Ca^{2+} , en las series con Pb^{2+} no se detectaron diferencias con los testigos (B0) 0 mM c/mm. Esto último concuerda con la apreciación de una tendencia no sistemática a la disminución de manchas en las series tratadas con plomo. Las interacciones entre el Ca^{2+} y el Pb^{2+} a nivel intracelular podrían haber provocado estos resultados. El control del experimentador sobre la homeostasis del calcio en un ensayo *in vivo* es algo que está fuera de su alcance. Por lo anterior es que las pequeñas variaciones intracelulares de ambos cationes, podrían haber contribuido a los resultados no sistemáticos que se encontraron en las series de experimentos.

5. CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que

1. En este ensayo se demostró que ninguno de los protocolos de tratamientos (pre y post-tratamiento) mostraron efectos genotóxicos sistemáticos que fueran causados por los nitratos de plomo y de calcio, Las diferencias significativas encontradas en las series con los nitratos no pueden ser explicadas con este ensayo.
2. Se demostró que con ninguno de los protocolos de tratamientos (pre y post-tratamiento) hay efectos sistemáticos moduladores de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción genotóxica del MMS. Las tendencias a un aumento en la cantidad de manchas por el nitrato de Ca o una disminución por el nitrato de Pb fueron heterogéneas y asistemáticas, por lo que no pueden ser explicadas.
3. El tratamiento agudo y el crónico con MMS, confirmaron el efecto genotóxico de este mutágeno en la prueba del ala de SMART.
4. Las diferencias sistemáticas encontradas entre los dos protocolos de tratamientos de las series con nitrato de Ca y de Pb son resultado de un efecto provocado por el pretratamiento a las 48 h de edad larval. Se dedujo que el efecto es resultado de un estrés oxidante que a esa edad larvaria no fue reparado de manera suficiente.
5. Se presentaron en los pretratamientos con y sin MMS, en los post-tratamientos con MMS y en los testigos positivos MMS y uretano, diferencias significativas entre el número de manchas totales de las hembras y los machos. Estas fueron resultado del pretratamiento, de la interacción Tratamiento * MMS y del tratamiento crónico con MMS y uretano (20 mM).
6. Las manchas gemelas, ocurrieron en cantidad mayor en las hembras de los tratamientos con MMS (12 mM) y el tratamiento crónico con uretano (20 mM), por lo que se deduce que se requieren ciertas condiciones para causar ese efecto.

7. Los resultados de ANOVAs hacen la interpretación difícil. Sin embargo el resultado principal de los tratamientos con nitrato de Pb y de Ca, es que no se encontró un efecto de las concentraciones de sales metálicas que se reflejara en una correlación o en un efecto verdaderamente sistemático con las concentraciones de sales metálicas utilizadas. Particularmente, las interacciones significativas entre MMS * Sales metálicas * Tratamiento no deberían ser interpretadas fuera del contexto general. Se deben considerar los resultados de la prueba de SMART y las pruebas no paramétricas de U (Mann-Whitney-Wilcoxon) y de H (Kruskall-Wallis) con las que se comprobó o desechó la respuesta significativa obtenida al aplicar ANOVA factorial en los tratamientos.

8. La representación gráfica de la distribución de las manchas totales/individuo hizo evidente la sobredispersión provocada por los tratamientos con MMS y a los sujetos que se localizan por arriba del percentil 90.

9. Al realizar pretratamientos se recomienda realizar siempre testigos con manipulación mínima (c/mm).

10. Los genes de la reparación del ADN de *D. melanogaster* incluidos en la Tabla 1.1 son similares con humanos (*Homo sapiens*), con ratones (*Mus musculus*), con el nemátodo *Caenorhabditis sp.*, con la planta vascular *Arabidopsis thaliana*, con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* y la bacteria *Escherichia coli* entre los principales. Esto confirma que *Drosophila melanogaster* es un buen modelo biológico para experimentación.

11. Una vez más se comprueba la utilidad y sensibilidad de la prueba del ala en *Drosophila melanogaster* para evaluar el efecto de compuestos químicos sobre el ADN en eucariotes.

6. REFERENCIAS

Alberts, B., Bray, D., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 1998. Essential Cell Biology. Garland Pub. Co. pp 276-284.

Amacher, D.E., Paillet, S.C., 1982. Induction of trifluorothymidine-resistant mutants by metal ions in L5178/TK +/- cells. Mutation Res. 78, 279-299.

Asmuss, M., Mullenders, L.H., Hartwig, A., 2000. Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. Toxicol. Lett. 112-113, 227-231. 2000.

Barzilay, G., Mol. C.D., Robson, C.N., Walker, L.J., Cunningham, R.P., Tainer, J.A., Hickson, I.D., 1995. Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. Nat. Struct. Biol. 2, 561-568.

Bauchinger, M., Schmid, E., Einbro, H.J., Dresch, J., 1976. Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium. Mutation Res. 40, 57-62.

7. Los resultados de ANOVAs hacen la interpretación difícil. Sin embargo el resultado principal de los tratamientos con nitrato de Pb y de Ca, es que no se encontró un efecto de las concentraciones de sales metálicas que se reflejara en una correlación o en un efecto verdaderamente sistemático con las concentraciones de sales metálicas utilizadas. Particularmente, las interacciones significativas entre MMS * Sales metálicas * Tratamiento no deberían ser interpretadas fuera del contexto general. Se deben considerar los resultados de la prueba de SMART y las pruebas no paramétricas de U (Mann-Whitney-Wilcoxon) y de H (Kruskall-Wallis) con las que se comprobó o desechó la respuesta significativa obtenida al aplicar ANOVA factorial en los tratamientos.

8. La representación gráfica de la distribución de las manchas totales/individuo hizo evidente la sobredispersión provocada por los tratamientos con MMS y a los sujetos que se localizan por arriba del percentil 90.

9. Al realizar pretratamientos se recomienda realizar siempre testigos con manipulación mínima (c/mm).

10. Los genes de la reparación del ADN de *D. melanogaster* incluidos en la Tabla 1.1 son similares con humanos (*Homo sapiens*), con ratones (*Mus musculus*), con el nemátodo *Caenorhabditis sp.*, con la planta vascular *Arabidopsis thaliana*, con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* y la bacteria *Escherichia coli* entre los principales. Esto confirma que *Drosophila melanogaster* es un buen modelo biológico para experimentación.

11. Una vez más se comprueba la utilidad y sensibilidad de la prueba del ala en *Drosophila melanogaster* para evaluar el efecto de compuestos químicos sobre el ADN en eucariotes.

6. REFERENCIAS

Alberts, B., Bray, D., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 1998. Essential Cell Biology. Garland Pub. Co. pp 276-284.

Amacher, D.E., Paillet, S.C., 1982. Induction of trifluorothymidine-resistant mutants by metal ions in L5178/TK +/- cells. Mutation Res. 78, 279-299.

Asmuss, M., Mullenders, L.H., Hartwig, A., 2000. Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. Toxicol. Lett. 112-113, 227-231. 2000.

Barzilay, G., Mol. C.D., Robson, C.N., Walker, L.J., Cunningham, R.P., Tainer, J.A., Hickson, I.D., 1995. Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. Nat. Struct. Biol. 2, 561-568.

Bauchinger, M., Schmid, E., Einbro, H.J., Dresch, J., 1976. Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium. Mutation Res. 40, 57-62.

Bauchinger, M., Dresp, J., Schmid, E., Englert, N., Krause, Chr., 1977. Chromosome analyses of children after ecological lead exposure. *Mutation Res.* 56, 75-80.

Beck, B.D., 1992. An update on exposure and effects of lead. *Fund. Appl. Tox.* 8, 1-16.

Bellinger, D., Leviton A., Rabinowitz M., Alfred E., Needleman H., Schoenbaum S., 1991. Weight gain and maturity in fetuses exposed to low levels of lead. *Environ. Res.* 54, 151-158.

Beyersmann, D., Hechtenberg, S., 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 247-261.

Bhattacharyya, D., Boulden, A.M., Foote, R.S., Mitra, S., 1988. Effect of polyvalent metal ions on the reactivity of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* 9, 683-685

Bhui-Kaur, A., Goodman, M.F., Tower, J., 1998. DNA mismatch repair catalyzed by extracts of mitotic, postmitotic, and senescent *Drosophila* tissues and involvement of *mei-9* gene function for full activity. *Mol. Cell Biol.* 18, 1436-1443.

Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 1992. Lead-induced cell proliferation and organ-specific tumorigenicity. *Drug. Metab. Rev.* 24, 409-416.

Calsoul, P., Frit, P., Bozzato, C., Salles, B., 1996. Negative interference of metal (II) ions with nucleotide excision repair in human cell-free extracts. *Carcinogenesis* 17, 2779-2782.

Christiansen, N.O., Larsen, C.S., Esmann, V., 1988. A study on the role of protein kinase-C and intracellular calcium in the activation of superoxide generation. *Biochim. Biophys. Acta* 971, 317-324.

Coni, P., Pichiri-Coni, G., Curto, M., Simbula, G., Giacomini, L., Sarma, D.S., Ledda - Cooper, W.C., Wong, O., Kheifets, L., 1985. Mortality among employees of lead battery plants and lead producing plants, 1947-1980. *Scand. J. Work. Environ. Health* 11, 331-345.

Corey, G., Galvao, L.A.C., 1989. Plomo. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. O.M.S., Metepec, Edo. de México. 103 p.

de Buendía, G. P., 1998. Search for DNA repair pathways in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res. / DNA Repair* 407, 67-84.

Dapkus, J., Merrell, D.J., 1977. Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87, 685-697.

Degawa, M. Arai, H., Miura, S., Hashimoto, Y., 1993. Preferential inhibitions of hepatic P450_{1a2} expression and induction by lead nitrate in the rat. *Carcinogenesis* 14, 1091-1094.

Deknadt, G., Deminatti, M., 1978. Chromosome studies in human lymphocytes after *in vitro* exposure to metal salts. *Toxicology* 10, 67-75.

- De la Rosa, M.E., 1984. Efecto de los metales pesados en las células germinales de *D.melanogaster* (Cd, Cr, Pb y Zn). Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Deutsch, W.A., Spiering, A.L., 1982. A new pathway expressed during a distinct stage of *Drosophila* development for the removal of dUMP residues in DNA. *J. Biol. Chem.* 257, 3366-3368.
- Deutsch, W.A., 1995. Why do pupating insects lack an activity for the repair uracil-containing DNA? One explanation involves apoptosis. *Insect. Mol. Biol.* 4,1-5.
- Dhir, H., Roy, A.K., Sharma, A., 1993. Relative efficiency of *Phyllanthus emblica* fruit extract and ascorbic acid in modifying lead and aluminum-induced sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow. *Environ. Mol. Mutagen.* 21, 229-236.
- Devoret, R., 1979. Tests bacterianos de sustancias potencialmente carcinogénicas. *Inv. Ciencia* 37, 3-16.
- Dock, L., 1989 Induction of rat liver glutathione transferase isoenzyme 7-7 by lead nitrate. *Biol. Trace Elem. Res.* 21, 283-288.
- Dusenbery, R. L., Smith, P.D., 1996. Cellular responses to DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res. / DNA Repair* 364,133-145.
- Evans, D.M., Moseley, B.E., 1985. Identification and initial characterisation of a pyrimidine dimer UV endonuclease (UV endonuclease beta) from *Deinococcus radiodurans*; a DNA-repair enzyme that requires manganese ions. *Mutat. Res.* 145, 119-128.
- Ferrante, E.D., 1979. Trace metals: exposure and health effects. Commission of the European Communities. Pergamon Press, Luxembourg, pp 158-161.
- Ferm, V.H., 1969. The syneratogenic effect of lead and cadmium. *Experientia* 25, 56-57.
- Foulkes, E.C. (ed.), 1990. Biological effects of heavy metals.II Metal carcinogenesis. CRC Press, Boca Ratón, pp 77-93.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Res.* 334, 247-258.
- Frenkel, G.D., Middleton, Ch., 1987. Effects of lead acetate on DNA and RNA synthesis by intact HeLa cells, isolated nuclei and purified polymerases. *Bioch. Pharm.* 36, 265-268.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., 1995. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington 698 p.
- Frölich, A., Würgler, F.E., 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Res.* 216, 179-187.

Fuentes-Aguilar, L., Soto-Mora, C., 1993. Influence of lead on pregnant women in metropolitan Mexico City. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 533-539.

Fullmer, C.S., 1997. Lead-calcium interactions: involvement of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Environ. Res.* 72, 45.

Gafter, U., Malachi, T., Ori, Y., Breitbart, H. 1997. The role of calcium in human lymphocytes DNA repair ability. *J. Lab. Clin. Med.* 130, 33-41.

Gerber, G.B., Leónard. A., Jacquet. P., 1980. Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. *Mutation Res.* 76, 115-141.

Goyer, R.A., 1990. Lead toxicity: from over to subclinical to subtle health effects. *Environ. Health. Perspect.* 86, 177-181.

Glaab, W.E., Tindall, K.R., Skopck, T.R., 1999. Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mutation Res.* 427(2), 67-68.

Graf, U., Würzler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188.

Graf, U., May, C.B., van-Schaik, N., 1990. On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 16, 225-237.

Graf, U., 1994. La situación actual de smart (prueba de mutación y recombinación somáticas) en *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10 (Suppl.1), 5-7.

Graf, U., 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51, 168-173.

Guzder, S.N., Kelley, M.R., Deutsch, W.A. 1991. *Drosophila* methyltransferase activity and the repair of alkylated DNA. *Mutation Res.* 255, 143-153.

Guzmán-Rincón, J., Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: a handbook*. Butterworth, F.M., Corkum, L.D., Guzmán-Rincón, J. (Eds.). Plenum Press. Pp 169-181.

Hällström, I., Blanck, A., 1985. Genetic variation in cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P450-dependent reactions. *Chem.Biol. Interac.* 56, 157-171.

Hansen, K., Stern, R.M., 1984. A survey of metal-induced mutagenicity *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. College Toxicol.* 3, 381-430.

Hartmann, A., Speit, G., 1996. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 98-104.

Hartwig, A., Beyersmann, D., 1989. Enhancement of UV-induced mutagenesis and sister-chromatid exchanges by nickel ions in V79 cells: evidence for inhibition of DNA repair. *SO: Mutat. Res.* 217, 65-73.

Hartwig, A., Schlegel, R., Beyersmann, D., 1990. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutation Res.* 241, 75-82.

Hartwig, A., Kruger, I., Beyersmann, D., 1994. Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. *Toxicol. Lett.* 72, 353-358.

Hartwig, A., 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals* 8, 3-11.

Hartwig, A., 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol. Lett.* 102-103, 235-239.

Heindorff, K., Aurich, O., Michaelis, A., Rieger, R., 1983. Genetic toxicology of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). *Mutat. Res.* 115, 149-173.

Hernández-Ávila, M., Romieu, Y., Rios, C., Rivero, A., Palazuelos, E., 1991. Lead-glazed ceramics as major determinants of blood lead levels in Mexican women. *Environ. Health Perspect.* 94, 117-120.

Hion, K., West, S.C., 1995. Characterisation of RuvAB-Holliday junction complexes by glycerol gradient sedimentation. *Nucleic Acids Res.* 23, 3621-3626.

Horváthová, E., Slameňová, D., Hlinčíková, L., Kupar Mandal, T., Gábelová, A., Collins, A.R. 1997. The nature and origin of DNA single strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Res. / DNA Rep.* 383, 243-252.

Hosfield, D.J., Guan, Y., Haas, B.J., Cunningham, R.P., Tainer, J.A., 1999. Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis. *Cell* 98, 397-408.

IARC (Seven Annual report on carcinogens), 1994. National Toxicology Programme. National Institute of Environmental Health Sciences. Research Triangle Park, NC.

Jacquet, P., Leonard, A., Gerber, G.B., 1977. Cytogenetic investigations on mice treated with lead. *J. Toxicol. Environ. Health* 2, 619-624.

Johnson, F.M., 1998. The genetic effect of environmental lead. *Mutation Res.* 410, 123-140.

Kai, M., Takahashi, T., Todo, T., Sakaguchi, K., 1995. Novel DNA binding proteins highly specific to UV-damaged DNA sequences from embryos of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 23, 2600-2607.

Karran, P., Bignami, M., 1999. Mismatch repair and cancer. En: Smith, P.J., Jones C.J., DNA recombination and repair: frontiers in molecular biology. Oxford Univ. Press, New York, p 66-98

Kasprzak, K.S., Hoover, K.L., Poirier, L.A., 1985. Effects of dietary calcium acetate on lead subacetate carcinogenicity in kidneys of male Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 6, 279-282.

Kasten, U., Mullenders, L.H., Hartwig, A., 1997. Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat. Res.* 383, 81-89.

Kobayashi, N., Okamoto, T., 1974. Effects of lead oxide on the induction of lung tumors in Syrian hamster. *J. Natl. Cancer Ins.*, 25, 1605-1610.

Koller, L.D., Kerkvliet, N.I., Exon, J.H., 1986. Neoplasia induced in male rats fed lead acetate, ethyl urea and sodium nitrate. *Toxicol. Pathol.* 13, 50-57.

Korzets, A., Chagnac, A., Weinstein, T., Ori, Y., Malachi, T., Gafter, U. 1999. H₂O₂ induces DNA repair in mononuclear cells: evidence for association with cytosolic Ca²⁺ fluxes. *J. Lab. Clin. Med.* 133, 362-369.

Kooistra, R., Zonneveld, J.B., Watson, A.J., Lohman, P.H., Pastink, A. 1999. Identification and characterisation of the *Drosophila melanogaster* O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase cDNA. *Nucleic Acid Res.* 27, 1795-1801.

Kooistra, R., Vreeken, K., Zonneveld, J.B., de Jong, A., Eecken, J.C., Osgood, C.J., Buerstedde, J.M., Lohman, P.H., Pastink, A. 1997. The *Drosophila melanogaster* RAD54 homolog, *DmRAD54*, is involved in the repair of radiation damage and recombination. *Moll. Cell. Biol.* 17(10), 6097-6104.

Lehmann, A.R., Bridges, B.A., Hanawalt, P.C., Johnson, R.T., Kanaar, R., Krokan, H.E., Kyrtopoulos, S., Lambert, B., Melton, D.W., Moustacchi, E., Natarajan, A.T., Radman, M., Sarasin, A., Seeberg, E., Smerdon, M.J., Smith, C.A., Smith, P.J., Thacker, J., Thomale, J., Waters, R., Weeda, G., West, S.C., van Zeeland, A.A., Zdzienicka, M.Z., 1996. Workshop on processing of DNA damage. *Mutation Res. / DNA Rep.* 364, 245-270.

Lerda, D., 1992. The effect of lead on *Allium cepa* L. *Mutation Res.* 281, 89-92.

Lohmann, R.D., Beyersmann, D., 1993. Cadmium and zinc mediated changes of the Ca²⁺-dependent endonuclease in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 1097-1103.

- Long, G.J., Rosen, J.F., Schanne, F.A., 1994. Lead activation of protein kinase C from rat brain. Determination of free calcium, lead and zinc by ^{19}F NMR. *J. Biol. Chem.* 269, 834-837.
- Markovac, J., Goldstein, G.W., 1988. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 334, 71-73.
- Meplan, C., Verhaegh, G., Richard, M.J., Hainaut, P., 1999. Metal ions as regulators of the conformation and function of the tumour suppressor protein p53: implications for carcinogenesis. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 565-571.
- Mol, C.D., Kuo, C.F., Thayer, M.M., Cunningham, R.P., Tainer, J.A., 1995. Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III. *Nature* 374, 381-386.
- Morgan, A.R., Chlebeck, J., 1989. Uracil-DNA glycosylase in insects. *Drosophila* and the locust. *J. Biol. Chem.* 264, 9911-9914.
- Myers, L.C., Verdine, G.L., Wagner, G., 1993. Solution structure of the DNA methyl phosphotriester repair domain of *Escherichia coli* Ada. *Biochemistry* 32, 14089-14094.
- Naegeli H., 1999. Enzymology of human nucleotide excision repair. En: Smith, P.J., Jones C.J., DNA recombination and repair: frontiers in molecular biology. Oxford Univ. Press, New York, p 99-137
- Nakagawa, K., 1992. Modification by phenobarbital of decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in livers of lead-treated mice. *Toxicol. Lett.* 62, 63-71.
- Narayan, S., He, F., Wilson, S.H., 1996. Activation of the human DNA polymerase promoter by a DNA-alkylating agent through induced phosphorylation of cAMP response element binding protein-1. *J. Biol. Chem.* 271, 18508-18513.
- O'Connor, T.R., Graves, R.J., de-Murcia, G., Castaing, B., Laval, J., 1993. Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *J. Biol. Chem.* 268, 9063-9070.
- Ogawa H.I., Shibahara T., Iwata H., Okada T., Tsuruta S., Kakimoto K., Sakata K., Kato Y., Ryo H., Itoh T., Fujikawa K., 1994. Genotoxic activities *in vivo* of cobaltous chloride and other metal chlorides as assayed in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Res.* 320, 133-140.
- OPS, 1979. Organización Panamericana de la Salud. Criterios de Salud Ambiental 3. O.P.S., México, 78.
- OMS, 1990. Guías de calidad del aire para Europa. Serie europea No.23, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. O.M.S., Metepec, Edo. de México, p.28

- O'Riordan, M.L., Evans, H.J., 1974. Absence of significant chromosome damage in males occupationally exposed lead. *Nature* 3247, 50-53.
- Orrenius, S., Burkitt, M.J., Kass, G.E., Dybukt, J.M., Nicotera, P., 1992. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann. Neurol.* 32, S33-42.
- Ortiz-Lombardia, M., Jimenez-Garcia, E., Garcia-Bassets, I., Azorin, F., 1998. The interaction of zinc(II) ions with antiparallel-stranded d(GA)_n DNA homoduplexes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16, 243-251.
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Wolfle, W., Wilson, S.H., Kraut, J., 1996. Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry* 35, 12742-12761.
- Popenoe, E.A., Schmaeler, M.A., 1979. Interaction of human-DNA polymerase B with ions of copper, lead and cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 109-120.
- Porello, S.L., Cannon, M. J., David, S.S., 1998. A substrate recognition role for the [4Fe-4S]₂⁺ cluster of the DNA repair glycosylase MutY *Biochemistry* 37, 6465-6475.
- Pounds, J.G., 1984. Effect of lead intoxication on calcium homeostasis and calcium-mediated cell function: a review. *Neurotoxicology* 5, 295-332.
- Prigent C. Lasko, D.D., Koddama-i, K., Woodgett, J.R., Lindahl, T. 1992. Activation of mammalian DNA ligase I through phosphorylation by casein kinase II. *EMBO J.* 11, 2925-2933.
- Prince, M.A., Friedman, B., Gruskin, E.A., Schrock, R.D. 3d., Lloyd, R.S., 1991. Selective metal binding to Cys-78 within endonuclease V causes an inhibition of catalytic activities without altering nontarget and target DNA binding. *J. Biol. Chem.* 266, 10686-10693.
- Radman, M., Wagner, R., 1988. Fidelidad de la duplicación del ADN. *Inv. Ciencia* 145, 20-28.
- Ramos, P., Abundis, H.M., Gaytán, J.C., Ordaz, M.G., Orozco, P.G., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E.M., Muñoz, J.A., 1993. Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill, México, p 131.
- Rasmuson, A., 1985. Mutagenic effects of some water soluble metal compounds in a somatic eye-color test system in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 157, 157-162.
- Reddy, T.P., Vaidyanath, K., 1978. Synergistic interaction of gamma rays and some metallic salts in the induction of chlorophyll mutations in rice. *Mutation Res.* 52, 361-365.
- Rossmann, T.G., Molina, M., Meyer, L.W., 1984. The genetic toxicology of metal compounds: I Induction of prophage in *E.coli* WP2s, *Environ. Mutag.* 6, 59-69.

- Roy, N.K., Rossman, T.G., 1992. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutation Res.* 298, 97-103.
- Rupp D., 1996. DNA repair mechanisms. En: Neidhardt, F.C., Curtiss III R., Ingraham, J.I., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H.E., *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. 2nd ed. ASM, Washington, D.C., 121, 2277.
- Saner, C., 1995. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 6A2: gene structure, expression pattern and metabolic capacity towards procarcinogens. Thesis for Doctor of Natural Sciences, Zürich.
- Scheffler, W. C., Prado-Campos, C., Martínez, J., 1981. Bioestadística. Fondo educativo interamericano, México, 267 p.
- Scicchitano, D.A., Pegg, A.E., 1987. Inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase by metals. *Mutation Res.* 192, 207-210.
- Sekowski, J.W., Malkas, L.H., Wei, Y., Hickey, R.J., 1997. Mercuric ion inhibits the activity and fidelity of the human cell DNA synthesome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 268-276.
- Shen, W., Kamendulis, L.M., Ray, S.D., Corcoran, G.B., 1992. Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca(2+)-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112, 32-40.
- Simons, T.J., 1993. Lead-calcium interactions in cellular toxicity. *Neurotoxicology* 14, 77.
- Singleton B. K., Jeggo P. A., 1999. Double-strand break repair and V(D)J recombination. En: Smith, P.J., Jones C.J., DNA recombination and repair: frontiers in molecular biology. Oxford Univ. Press, New York, 16-37
- Sirover, M.A., Loeb, L.A., 1976. Infidelity of DNA synthesis *in vitro*: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science* 194, 1434-1436.
- Skreb, Y., Habazin-Novak, V., 1977. Lead induced modifications of the response to X-rays in human cells in culture. *Stud. Biophys.* 63, 97-99.
- Smith, P.D., Dusenbery, R.L., 1989. Mutations at six additional loci of *Drosophila melanogaster* cause alkylation hypermutability. *Mutation Res.* 218, 21-24.
- Snyder, R.D., Lachmann, P.J., 1989. Thiol involvement in the inhibition of DNA repair by metals in mammalian cells. *Mol. Toxicol.* 2, 117-128.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free. Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.

Sokol, R.Z., Berman, N., 1991. The effect of age of exposure on lead-induced testicular toxicity. *Toxicology* 69, 269-278.

Srivenugopal, K.S., Ali-Osman, F., 1990. Stimulation and inhibition of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-induced strand breaks and interstrand cross-linking in Col E1 plasmid deoxyribonucleic acid by polyamines and inorganic cations. *Biochem-Pharmacol.* 40, 473-479.

Sunderman, F.W. Jr., 1989. Mechanisms of nickel carcinogenesis. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 5, 1-12.

Takahashi, K., Imaeda, T., Kawazoe, Y., 1988. Effect of metal ions on the adaptive response induced by N-methyl-N-nitrosourea in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157, 1124-1130.

Takahashi, K., Imaeda, T., Kawazoe, Y., 1991. Inhibitory effect of cadmium and mercury ions on induction of the adaptive response in *Escherichia coli* [published erratum appears in *Mutat. Res.* 1991, 254,299-300] *Mutat. Res.*, 254, 45-53.

Yamada, H., Miyahara, T., Sasaki, Y.F., 1993. Inorganic cadmium increases the frequency of chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, 302, 137-145.

Vallee B.L., Ulmer, D.D., 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 91-128.

van Schaik, N., Graf, U., 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 260, 99-104.

Vogel, E.W. 1986. O-alkylation in DNA does not correlate with the formation of chromosome breakage events in *D. melanogaster*. *Mutation Res.* 162, 201-213

Vogel, E.W., 1992. Tests for recombinogens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* 284, 159-175.

Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H.J., Nivard-MM., 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC-Sci-Publ.* 146, 427-470.

Weisel, C., Demak, M., Marcus, S., Goldstein, B.D., 1991. Soft plastic bread packaging: lead content and reuse by families. *Am. J. Public. Health* 81, 736-758.

Wu, X., Lieber, M.R., 1997. Interaction between DNA-dependent protein kinase and a novel protein, KIP. *Mutation Res. / DNA Rep.* 385, 13-20.

Yee-Chien, L., Haime, H., 1996. Lowering extracellular calcium content protect cells from arsenite-induced killing and micronuclei formation. *Mutagenesis* 11, 75-78.

Zelikoff, J.T., Li, J.H., Hartwig, A., Wang, X.W. Costa, M., Rossman, T.G., 1988. Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis* 9, 1727-1732.

APÉNDICE (INTRODUCCIÓN)

Tabla 1.1. GENES DE *Drosophila melanogaster* INVOLUCRADOS EN LA REPARACIÓN DEL ADN

(1) Reparación pre-replicadora

Mutantes de la mayoría de los mecanismos de reparación libres de error

(a) Reparación directa del daño

(a.1.) Eliminación de grupos alquilo de las bases

Símbolo genético y nombre del gen	Función del gen	Fenotipo mutante	Homologías, analogías y similitudes
<i>agt</i> (=CG1303, <i>DmAGT</i>) <i>O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase</i>	Metil-ADN-[proteína]-cistein-S-metiltransferasa que repara <i>O⁶-G</i> , <i>N⁷-G</i> , <i>O⁴-T</i> y <i>N³-A</i> ; ausente en embriones	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase</i>), ratones (<i>Mgmt</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>MGT1</i>) y <i>S. typhimurium</i> (<i>ada</i>)

(a.2.) Fotoreparación de lesiones por UV

<i>phr</i> (=CG11205, <i>DmCPD</i>) <i>photorepair</i>	Desoxirribodipirimidina fotoliasa clase II. Escisión de ciclobutano pirimidín dímeros (<i>CPDs</i>); mayor actividad en ovario y embriones	Hipersensibilidad a UV; carece de factor 2 de escisión	Homólogo en pez dorado <i>Carassius (photolyase)</i> , marsupiales opossum <i>Monodelphis (photolyase)</i> , archeobacteria, pero no en humanos, ni mamíferos
<i>phr6-4</i> <i>(6-4)-photolyase</i>	Desoxirribodipirimidina fotoliasa clase II. Escisión de fotoproductos de pirimidín/pirimidona (<i>6-4PPs</i>); mayor actividad en ovario y embriones	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>KIAA0658</i>), ratones (<i>Cry2</i>), <i>Arabidopsis (6-4-photolyase)</i> mostaza y <i>S. cerevisiae (PHR1)</i>

(b) BER: reparación por escisión de bases

(b.1.) Glucosilasas y/o con actividad endonucleasa (liasas AP)

<i>BcDNA LD19945</i> (=CG1795)	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i> ; repara la guanina con un oxígeno en el C8; liasa AP	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>), ratones (<i>Ogg1</i>), ratas (<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>) y <i>S. cerevisiae (OGG1)</i>
<i>Udg</i> <i>Uracil DNA glycosylase</i>	Uracil ADN glucosilasa. Elimina fragmentos con residuos de pirimidina; restringida a cigotos y tercer estadio larvario	No se conocen mutantes	
<i>CG5285</i>	Uracil ADN glucosilasa; proteína monofuncional selectiva de una sola cadena	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos y <i>Xenopus (single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase)</i>
<i>Thd1</i> (=CG1981)	<i>G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase</i> . Corta en sitios 3' del sitio AP; también interviene en NER	No se conocen mutantes	Homólogos en humanos (<i>thymine DNA-glycosylase</i>), ratones, <i>S. pombe (putative G/T mismatch-specific-thymine DNA glycosylase)</i>
<i>RpPo</i> (<i>AP3</i> , <i>P0</i> , <i>CG7490</i>) <i>Ribosomal protein P0</i>	Liasa AP y proteína estructural del ribosoma; en la reparación actúa como endonucleasa AP en 5'	Letales recesivos	Homólogo en humanos (<i>RPLP0</i>), ratones (<i>Arbp</i>), ratas, <i>Caenorhabditis (F25H2.10)</i> , <i>S. cerevisiae (acidic ribosomal protein P0.e, cytosolic)</i> y <i>E. coli (recA)</i>
<i>RpS3</i> (=CG6779, <i>minute(3)95A</i>) <i>Ribosomal protein S3</i>	Proteína multifuncional: N-glucosilasa y endonucleasa AP en 8-oxoguaninas. Corta extremo 3' del sitio AP por un mecanismo dependiente de <i>Mg²⁺</i> ; actividad dRpsa en 5', es componente de la subunidad ribosomal 40S	Fenotipo dominante visible, <i>minute</i> , letal en homocigotos	Homólogo en humanos (<i>RPS3</i>), ratones, <i>Xenopus</i> , ratas (<i>S3</i>), <i>Caenorhabditis (C23G10.3)</i> , <i>S. cerevisiae (RPS3)</i> y <i>E. coli (Fpg)</i>

<i>Apl</i> Apurinic/aprimidic endonuclease I	Existencia tentativa; corta sitios AP en 3' dejando 3'- desoxirribosa-fosfato y 5'-OH en el sitio AP	No se conocen mutantes	
<i>AplII</i> Apurinic/aprimidic endonuclease II	Existencia tentativa; corta sitios AP en 3' dejando 5'- desoxirribosa-fosfato y 3'-OH en el sitio AP	No se conocen mutantes	
<i>Rrp1</i> (=CG3178, <i>RRP1</i> , <i>strand</i> <i>transferase</i>) <i>Recombination repair protein I</i>	Liasa AP que forma complejos con Mn ²⁺ ; reparación por recombinación homóloga, endonucleasa; 3'-5' exonucleasa, 3' fosfomonoesterasa, 3' fosfodiesterasa y ribonucleasa; repara daño oxidante y por alquilantes.	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>APEX</i> - <i>nuclease</i> , <i>HAP1</i>), ratones (<i>Apex</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>Arp</i>) <i>Caenorhabditis</i> (similar to <i>AP endonuclease family</i> <i>1</i>), <i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>ExoA</i>), exonucleasa III en <i>E. coli</i> (<i>xthA</i>)

(c) **NER: reparación por escisión de nucleótidos**

Reparación de lesiones por UV y alquilaciones

Análogos del grupo epistático RAD3 de levaduras y de los genes *Xeroderma pigmentosum* (XP)

<i>Xpac</i> (=CG6358, <i>dmXPA</i>) <i>Xeroderma pigmentosum group</i> <i>A-like</i>	Reconocimiento del daño en NER; motivo Zn-finger; constitutivo en embriones y adultos	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>hXPA</i>), ratones (<i>Xpa</i>), pollos, <i>Xenopus</i> , <i>Caenorhabditis</i> y <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD14</i>)
<i>RpA-70</i> , <i>RpA-30</i> , <i>RpA-8</i> . <i>Replication proteins A-70</i> , <i>A-</i> <i>30</i> y <i>A-8</i>	Subunidades (70, 30 y 8 kD) del factor de replicación proteína A (proteínas SSB) que se unen a la cadena simple de ADN durante la replicación, NER, MMR y reparación por recombinación.		Homólogo en humanos (<i>rpa1</i>), ratones, <i>Xenopus</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> (<i>rfa1</i>)
<i>mus210</i> (=CG8153, <i>DmXPC</i> , <i>mus212</i>) <i>mutagen-sensitive 210</i>	Unión al ADN dañado, posiblemente se une a Rad23	Hipersensible al MMS y a la mostaza nitrogenada, pero no a los rayos gamma; actividad endonucleasa muy reducida	Homólogo en humanos (<i>hXPC</i>), ratones (<i>Xpc</i>) y <i>S. cerevisiae</i> (<i>excision repair protein RAD4</i>)
<i>Rad23</i> (=CG1836, <i>rad23</i> , <i>DHR23</i>)	Proteína semejante a la ubiquitina que funciona como chaperona, se une específicamente al ADN dañado, permitiendo el plegamiento apropiado y complejos multiproteicos; estimula a NER <i>in vitro</i>	Proteína estructural del ribosoma; levemente sensibles a UV	Homólogo en humanos (<i>RAD23</i> (<i>S.</i> <i>cerevisiae</i> <i>homolog B</i>), ratones (<i>Rad23a</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>orf12</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>similarity to human</i> <i>RAD23 protein homolog 2</i>), <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> (<i>rad23</i>), <i>S. pombe</i> (<i>uv</i> <i>excision repair protein rad23</i> <i>homolog</i>))
CG10694	Reparación del ADN involucrado en la síntesis de proteínas y componente del ribosoma	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>RAD23-B</i>), ratones (<i>Rad23b</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> (<i>uv excision repair</i> <i>protein</i>), <i>S. pombe</i> (<i>uv excision</i> <i>repair protein rad23 homolog</i>)
<i>DdbP1</i> , <i>DdbP2</i> , <i>DdbP3</i> <i>Damage-specific DNA-binding</i> <i>protein 1, 2, 3</i>	Reconoce y se une selectivamente al ADN dañado con UV; repara dímeros de pirimidinas por corte en los lados 3' y 5' de la lesión en el ADN, en presencia de Mg ²⁺	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos y <i>Caenorhabditis</i>
CG13900	Proteína del tipo spliceosoma; Se une al ARN e interviene en la reparación ¿reconocimiento del daño?	No se conocen mutantes	Posible homólogo de <i>hXPE</i> en humanos; similar en humanos (<i>KIAA0017</i>), ratones (<i>damage-</i> <i>specific DNA binding protein 1</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>hypothetical 153.8kD protein in</i> <i>Gal80-PRP39 intergenic region</i>)
<i>hay</i> (=CG8019, <i>Ercc3</i> , <i>dmXPB</i> , <i>Dhr25</i>) <i>haywire</i>	Subunidad del factor de transcripción TFIIH; 3'-5' helicasa; ADN helicasa dependiente de ATP, constitutivo a bajos niveles, interacciona con la beta- tubulina (citoesqueleto)	<i>hay(nc2)</i> es mutante en el dominio VI de la helicasa, afecta la meiosis de machos; reduce la fertilidad en hembras, los alelos "nulos" son letales recesivos; los heterocigotos <i>hay</i> /+ son hipersensibles a la UV	Homólogo en humanos (<i>ERCC3</i> , <i>hXPB</i>), ratones (<i>Ercc3</i>), <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> (<i>SSL2</i> , <i>RAD25</i>) <i>Ciona</i> , <i>Arabidopsis</i> (<i>araxPB</i>)

<i>XPD</i> (=CG9433, <i>XPD/ERCC2,Dhr3</i>) <i>Xeroderma pigmentosum D</i>	Subunidad del factor de transcripción TFIIF; helicasa 5'-3' ADN - ADN y ADN-ARN; ATPasa dependiente de ADN de una sola cadena y de Mg ²⁺ o Mn ²⁺	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>hXPD, ERCC2</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> (<i>F25H2.13</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD3</i>)
<i>mei9</i> (=CG3697, <i>mus110, DmXPF</i>) <i>meiotic 9</i>	Endonucleasa de lesión en 5'; ciertos tipos de corrección de errores (<i>MMR</i>); recombinación meiótica en hembras en el extremo 3'; corta dímeros de pirimidina; no repara <i>DSBs</i> ; motivo rico en cisteína que se une al Zn ²⁺	Hipersensible a MMS, gammas, mostaza nitrogenada, rayos X y UV; baja fertilidad; incrementa la no - disyunción en hembras	Homólogo en humanos (<i>hXPF, Ercc4</i>), ratones (<i>ERCC4</i>), <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>S. pombe</i> (<i>RAD16</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD1</i>), <i>E. coli</i> (<i>uvrCB</i>)
<i>Ercc1</i> (=CG10215)	Endonucleasa de lesión 5'	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>ERCC1</i>), ratones (<i>Ercc1</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>Lilium longiflorum</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD10</i>)
<i>mus201</i> (=CG10890, <i>rad202, DmXPG</i>) <i>mutagen-sensitive 201</i>	Subunidad del factor de transcripción TFIIF; endonucleasa de lesión en 3'; no interviene en corrección de errores (<i>MMR</i>); corta dímeros de pirimidina, componente del citoesqueleto	Hipersensible a MMS, gammas, mostaza nitrogenada y debilmente sensible a rayos X, repara <i>SSBs</i> provocadas por rayos X; sensibilidad a UV según el sexo.	Homólogo en humanos (<i>ERCC5</i>) ratones (<i>repair protein XPG</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD2</i>)
<i>Tfb1</i> (=CG8151, <i>TFB1</i>)	Subunidad del factor de transcripción TFIIF. Complejo con subunidades del RFIK (<i>replication-coupling assembly factor IK</i>); involucrado en el ciclo celular y reparosoma	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>p62, Gtf2h1</i>), ratón, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>TFB1</i>), <i>S. pombe</i> (<i>putative rna polymerase ii transcription factor b subunit</i>)
<i>Tfb2</i> (=CG7764, <i>TFB2</i>)	Subunidad del factor de transcripción TFIIF.	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>general TFIIF, polypeptide 4 (52kd subunit)</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>YPL122c</i>)
<i>Ssl1</i> (=CG11115, <i>SSL1</i>)	Subunidad del factor de transcripción TFIIF	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>BTF2, 44kd subunit</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>T16H12.4</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>SSL1</i>)
<i>Cdk7</i> <i>Cyclin-dependent kinase 7</i>	Cinasa Ser/ Treo dependiente de ciclina, involucrada en el inicio de la transcripción del promotor Pol II que es un componente del factor TFIIF; se expresa en ovarios y controla la transcripción en embriones y larvas. Se requiere para la activación de <i>cdc2 in vivo</i>	Sensibles a temperatura	Similar en humanos (<i>CDK7</i>), ratones (<i>Cdk7</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>T05G5.3</i>), <i>African clawed frog</i> (<i>protein kinase, 40K</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>KIN28</i>)
<i>Cdk8</i> <i>Cyclin-dependent kinase 8</i>	Cinasa Ser/ Treo dependiente de ciclina, involucrada en la fosforilación de una subunidad de la ARN polimerasa II, interactúa con <i>CycC</i>	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>cyclin dependent kinase 8</i>), ratones (<i>cyclin-dependent kinase p130-PITSLRE</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>ssn3</i>)
<i>CycH</i> <i>Cyclin H</i>	Regulador del ciclo celular, factor de transcripción de la ARN polimerasa II involucrado en el inicio de la transcripción del promotor Pol II, componente del factor TFIIF;	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>p37/ cyclin H</i>), ratones (<i>G1/S-specific cyclin C</i>), <i>Xenopus</i> (<i>cyclin H MO15-associated protein (p36)</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>CCL1</i>)
<i>Mat1</i>	Regulador del ciclo celular, factor de transcripción de la ARN polimerasa II involucrado en el inicio de la transcripción del promotor Pol II, componente del factor TFIIF; complejo con subunidades del RFIK (<i>replication-coupling assembly factor IK</i>) y reparosoma	No se conocen mutantes	Homólogo a MAT1 de humanos, ratones (<i>Mat1</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>similar to human cdk7/ cyclin H assembly factor</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>transcription/ repair factor TFIIF subunit Tfb3</i>)

<i>mus209</i> (=CG9193, <i>DmPCNA</i>) <i>mutagen-sensitive 209</i>	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> ; constitutiva, mayor actividad en ovarios, huevos y embriones tempranos; interviene en la replicación y reparación; enlaza la ADN polimerasa; cofactor de las polimerasas delta y epsilon en NER, indispensable en la reparación de DSBs, se une al ADN e interviene en <i>MMR</i>	Hipersensible a MMS, rayos gamma, pero no a mostaza nitrogenada	Homólogo en humanos (<i>PCNA</i>), ratones (<i>Pcna</i>), <i>S.cerevisiae</i> (<i>POL30</i>)
<i>DNApol- epsilon</i> (=CG6768) <i>DNA-polymerase epsilon</i>	Subunidad A de la ADN polimerasa epsilon, factor de replicación y 3' - 5' exodesoxirribonucleasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>DNA polymerase epsilon, catalytic polypeptide</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>POL2</i>)
CG10489	Subunidad B de la ADN polimerasa epsilon, factor de replicación	No se conocen mutantes	Similar en <i>Caenorhabditis</i> (<i>FQ8B4.5</i>), ratones (<i>Pole2</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>DPB2</i>), <i>S. pombe</i> (putative <i>DNA polymerase epsilon, subunit b</i>)
<i>Cdk9</i> <i>Cyclin-dependent kinase 9</i>	Subunidad de una cinasa Ser/ Treo que fosforila el dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa permitiendo el alargamiento del preARNm	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>cyclin-dependent kinase 9 (cdc2-related kinase)</i>), ratones (<i>Cdc211</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>CTK1</i>)
CG17227	ADN ligasa III dependiente de ATP, función en <i>BER</i> y <i>NER</i>	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>Lig III-DNA-ATP dependent</i>), ratones (<i>DNA-LigIII-beta</i>) <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>cdc9</i>) y virus <i>Vaccinia</i>
<i>Rad21</i> (=CG17436, <i>Drad21</i> , <i>Scc1</i>)	Cohesina de cromátidas hermanas mitóticas; se expresa en embriones y larvas	No se conocen mutantes	Similar en <i>S. pombe</i> (<i>rad21</i>)
<i>mus207</i> <i>mutagen-sensitive 207</i>		Sensible a químicos y a radiaciones	
<i>mus204</i> <i>mutagen-sensitive 204</i>		Deficiente en la reparación de alquilos y UV; hipersensible a MMS, formaldehído y UV; débilmente sensible a mostaza nitrogenada pero no a rayos X; disminuye recombinación y aumenta no disyunción	

hXP designa a los genes humanos correspondientes a los grupos incluidos de A a G de *Xeroderma pigmentosum*. Para los homólogos de *hXPA*, *hXPD* y el posible homólogo de *hXPE*, los genes de *Drosophila* se han identificado solamente por secuenciación. Los muy bien conocidos mutantes de la reparación por escisión *mei9* y *mus201* de *Drosophila* fueron recientemente identificados como homólogos de *hXPF* y *hXPG* respectivamente, y *mus210* como homólogo de *hXPC*. El homólogo *DmXPB* de las mutaciones *haywire* afecta la meiosis de machos; algunos alelos provocan la esterilidad en hembras. *XPA* podría ser un supresor de tumores.

(d) Reparación específica por escisión de enlaces cruzados en el ADN

<i>mus115</i>		Hipersensibilidad a puentes con la mostaza nitrogenada específicos; hipersensible al MMS sólo marginalmente	
---------------	--	---	--

(e) Reparación pre-replicadora para daños por agentes alquilantes y radiación ionizante

(No para daños por UV)

<i>mus106</i> <i>mutagen-sensitive 106</i>	Endonucleasa que repara grupos alquilo	Hipersensibles a MMS, rayos gamma, pero no a UV, ni a mostaza nitrogenada; hembras estériles	
<i>mus207</i> <i>mutagen-sensitive 207</i>	Endonucleasa que repara grupos alquilo	Hipersensibles a MMS, mostaza nitrogenada, UV, pero débilmente a los rayos X y formaldehído	

<i>mus306</i> <i>mutagen-sensitive 306</i>	Endonucleasa que repara alquilos	Escisión parcialmente deficiente; hipersensible a MMS pero no a la mostaza nitrogenada ni a rayos X. Originalmente se observó que reparaba por escisión a dímeros de pirimidina, ahora se atribuye esta reparación a la presencia del gen <i>phr</i> en esta línea	
---	----------------------------------	--	--

(2) Reparación post-replicadora

Mutantes de genes involucrados en mecanismos de corrección de errores. Análogos al grupo Rad6 de *S. cerevisiae*

(a) Reparación de errores debidos a translesión

<i>mus101</i> (=CG11156) <i>mutagen-sensitive 101</i>	Reparación de grupos alquilo por recombinación de no homólogos; reparación de puentes y rompimientos dobles; regula puntos de chequeo post-replicativos G2/M si el inicio de S fue deficiente	Hipersensible a MMS, acetaminofluoreno, mostaza nitrogenada, rayos X y UV, baja fertilidad; sensible a cafeína; inestabilidad cromosómica y elevada no-disyunción en hembras	Análogo a RAD6 de levaduras; homólogo en humanos (<i>similar to S. pombe -rad4+/cut5+product (A40727)</i>), ratones (<i>ect2 transforming protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>similar to BRCA1C terminus (BRCT) domain (4 domains)</i>)
<i>mus206</i> <i>mutagen-sensitive 206</i>	Reparación por escisión de grupos alquilo	Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada, UV, pero no a rayos X	
<i>mus310</i> <i>mutagen-sensitive 310</i>	Reparación de grupos alquilo y daños por UV; reparación post-replicativa <i>translesion synthesis</i>	Post-replicación defectuosa con síntesis de ADN modificada; hipersensible a MMS, rayos X y UV, pero no a mostaza nitrogenada	
<i>mus205</i> (=CG1925, <i>DhRev3</i>) <i>mutagen-sensitive 205</i>	Subunidad catalítica de la ADN polimerasa zeta; funciona en reparación post-replicativa y NER	Hipersensible a MMS y UV, pero no a mostaza nitrogenada y radiación ionizante; reduce la replicación en cadenas dañadas y sin dañar; deficiente en factor 2 de escisión	Similar en humanos, ratón (<i>DNA polymerase zeta catalytic subunit</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>similar to DNA polymerase family B</i>), <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>REV3</i>)
<i>DNApol-eta</i> (=CG7143, <i>POLH</i> , <i>drad30A</i>)	ADN polimerasa de eucariotes; <i>translesion synthesis</i> del daño por UV, O ⁶ -MG, aductos N2-guanine y 8-oxo-guanina. Enzima de baja fidelidad que incorpora nucleótidos incorrectos	No se conocen mutantes	Homólogo de humanos (<i>organic cationic transporter-like 3</i>), ratones (<i>OCTN1</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Brugia</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>hypothetical protein YDR419w</i> , <i>RAD30</i>)
<i>DNApol-iota</i> (=CG7602, <i>drad30B</i>)	ADN polimerasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>&agr;</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>UMUC</i>) y <i>E. coli</i> (<i>DNA damage inducible protein P</i>)
<i>Hus1-like</i> (=CG2525, <i>Hus1</i>)	Reparación y control del ciclo celular en el punto de chequeo S/G2	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>HUS1 (S. pombe) checkpoint homology</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> y <i>S. pombe</i> (<i>hus1</i>)
<i>Rad9</i> (=CG3945)	Controla el ciclo celular en el punto de chequeo S/G2 podría estar involucrado en G1/S; supresión de tumores	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos, ratones, <i>Caenorhabditis</i> y <i>S. pombe</i> (<i>RAD9</i>)
<i>UbcD6</i> (=CG2013, <i>Dhr6</i>) <i>Ubiquitin conjugating enzyme</i>	Enzima <i>ubiquitin ligating</i> que está involucrada en el ciclo de la ubiquitina	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>UBE2A</i> , <i>UBE2B</i>), ratones (<i>Ube2a</i> , <i>Ube2b</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD6</i>)
<i>mus108</i> <i>mutagen-sensitive 108</i>		Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada y UV, deficiente en reparación de alquilos	
<i>mus311</i> <i>mutagen-sensitive 311</i>		Post-replicación defectuosa con síntesis de ADN modificada; hipersensible al MMS y UV, pero no a mostaza nitrogenada; si las hembras son fértiles producen elevadas tasas de no-disyunción	

(b) Reparación post-replicadora recombinogénica de rompimientos en ambas cadenas (DSBs)

Análogos al grupo RAD52 de levaduras. No solamente se reparan las DSBs, en ocasiones son reparadas otras lesiones

<i>Rad1</i> (=CG3240)	Controla el ciclo celular en el punto de chequeo S/ G2; reparación de DSBs	Elimina el ADN no homólogo de los extremos 3' del ADN recombinante; no se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>RAD1</i>), ratones y <i>S. pombe</i> (<i>RAD1</i>)
<i>Rad17</i> (=CG7825)	Controla el ciclo celular en el punto de chequeo S/ G2; supresión de tumores		Homólogo en humanos (<i>RAD17</i> (<i>S. pombe</i>) homolog), ratones (<i>RF-C/ activator 1 homolog</i>), <i>Caenorhabditis</i> y <i>S. cerevisiae</i> (<i>checkpoint protein RAD24</i>) y <i>S. pombe</i> (<i>rad17</i>)
<i>mei-41</i> (=CG4252, <i>mei-195</i> , <i>mus103</i> , <i>mus104</i>) <i>meiotic 41</i>	Fosfatidilinositol 3-cinasa de la familia ATM, con dominios ricos en Pro y "zippers" de Leu; detección del daño y activa los puntos de chequeo del ciclo celular; se expresa en ovarios, repara rompimientos cromosómicos; recombinación de no homólogos en hembras	Sensible a cafeína, rayos X y UV; larvas hipersensibles a hidroxurea; carece del factor 1 de escisión; aumenta la pérdida de cromosomas meióticos y la no-disyunción	Similar en humanos (<i>ATR/ FRP1</i>); <i>Caenorhabditis</i> (<i>ATM-like protein</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>ESR1</i> , <i>tor1</i> , <i>tor2</i> , <i>tel1</i>), <i>S. pombe</i> (<i>rad3</i>)
<i>mus309</i> (=CG5247, <i>Irbp</i> , <i>Ku70</i>) <i>mutagen-sensitive 309</i>	Subunidad de DNA-PK (cinasa Ser / Tre) dependiente de ADN, helicasa dependiente de ATP, recombinación meiótica y reparación por unión específica a los extremos de los DSBs.	Mutación en <i>IRBP/ Ku p70</i> (<i>inverted repeat binding protein</i>)	Homóloga en humanos (<i>G22P1</i>), ratones (<i>G22p1</i>), <i>Xenopus</i> (<i>human Ku70 autoantigen homolog</i>)
<i>Ku80</i> (=BG:DS09217.6, CG13241, CG18801)	Helicasa dependiente de ATP	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>nuclear factor IV</i>)
<i>okr</i> (=CG3736, <i>Dhr54</i> , <i>DmRAD54</i>) <i>okra</i>	Helicasa del ADN dependiente de ATP y ADN helicasa; recombinación meiótica y mitótica, reparación de DSBs, se expresa en el ovario y es constitutiva	Algunos con hembras estériles; aumenta el daño por rayos X y MMS	Homóloga en humanos a helicasa con Zn-finger (<i>RAD54</i> (<i>S. cerevisiae</i>) -like), ratones (<i>Rad54I</i>), gallo, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>rad54</i>)
CG12407	Reparación por recombinación y de DSBs, proteína motora componente del citoesqueleto que interviene en los procesos del desarrollo		Similar en humanos (<i>Rad50</i>), ratones (<i>Myhca</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>rad50</i>)
<i>Rad51</i> (CG7948, <i>DmR1</i>) <i>Rad51-like</i>	ATPasa dependiente del ADN, recombinasa meiótica de hembras; reparación de DSBs; también debe funcionar en las células mitóticas; reprimido en meiosis de machos	No se conocen mutantes	Similar en humanos, ratones (<i>rad51</i>), <i>Xenopus</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>Coprinus</i> , <i>Lycopersicon</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD51</i> , <i>dmc1</i>), <i>E. coli</i> (<i>recA</i>)
<i>Rad51C</i> (=CG2412)	ATPasa dependiente del ADN, recombinasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>RAD51</i> (<i>S. cerevisiae</i>) - like 3'), ratones (<i>Rad5113</i>)
<i>Rad51D</i> (=CG6318)	ATPasa dependiente del ADN, recombinasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells</i>), ratones (<i>recA / RAD51 family protein</i>)
<i>mus304</i> (=CG7347) <i>mutagen-sensitive 304</i>	Helicasa del ADN dependiente de ATP relacionada con RecQ, componente del citoesqueleto; punto de chequeo en S/ G2 del daño al ADN	Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada; no es sensible a rayos-X; sensible a la cafeína; detiene el desarrollo embrionario; parcialmente deficiente en post-replicación, y recombinación meiótica; originalmente se observó que reparaba por escisión a dímeros de pirimidina, ahora se atribuye esta reparación a la presencia del gen <i>phr</i> en esta línea	<i>Dugesia japonica</i> (<i>myosin heavy chain</i>), <i>E. coli</i> (<i>RecQ</i>)

<i>RecQ4</i>	ATPasa dependiente del ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>RecQ protein 4</i>), ratones (<i>Wrn protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>SGS1</i>)
<i>mre11</i> (=CG16928, <i>MRE11</i>) <i>meiotic recombination 11</i>	Endonucleasa y exonucleasa que interviene en NER	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>MRE11</i>), ratones, <i>Xenopus</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>MRE1</i>)
<i>mus312</i> <i>mutagen-sensitive 312</i>	Interviene en la recombinación meiótica	Hipersensible a la alquilación, mostaza nitrogenada y rayos X; sensible a la cafeína; aumenta en meiosis la no-disyunción	
<i>mus308</i> (=CG6019, <i>Nuc3</i>) <i>mutagen-sensitive 308</i>	Reparación post-replicativa de de puentes y de daños por UV; reparación de enlaces con grupos alquilos; helicasa, deoxirribonucleasa	Reparación pre-replicativa normal en el mutante. Hipersensibilidad a los formadores de puentes, UV y ENU; deficiente en síntesis de ADN semiconservativa; reparación por recombinación de O-alquil-pirimidinas, insensible a alquilantes monofuncionales; carece del factor 2 de escisión; se expresa en ovarios. Originalmente se observó que reparaba por escisión a dímeros de pirimidina, ahora se atribuye esta reparación a la presencia del gen <i>phr</i> en esta línea	Homologías con la polimerasa I de procariontes y la proteína POLQ en humanos (<i>DNA pol theta</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> y <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>G9365 ORF</i>)
<i>mus302</i> <i>mutagen-sensitive 302</i>		Hipersensible al MMS, mostaza nitrogenada, UV y rayos X; las hembras con fertilidad pobre; sensible a la cafeína, deficiente en post-replicación y parcialmente en escisión	

No todos los alelos de *mei-41* producen hembras estériles. *hATM*: Ataxia telangiectasia, gen supresor de tumores

(3) Genes sensibles a mutágenos, sin clasificar

<i>mus102</i> <i>mutagen-sensitive 102</i>	Aumenta la frecuencia de manchas <i>mwh</i> en moscas <i>mwh</i> / +; desestabiliza a los cromosomas mitóticos; causa moderada no-disyunción	No es un mutante de la reparación por escisión; hipersensible a MMS, formaldehído y rayos gamma	
<i>mus105</i> <i>mutagen-sensitive 105</i>	Aumenta la frecuencia de manchas <i>mwh</i> en moscas <i>mwh</i> / +; desestabiliza a los cromosomas mitóticos	Hipersensible a MMS y rayos X, recesivos letales. Aumento de la frecuencia de intercambios y rompimientos en la eucromatina de células mitóticas	
<i>mus109</i> <i>mutagen-sensitive 109</i>	Aumenta la frecuencia de manchas <i>mwh</i> en moscas <i>mwh</i> / +; desestabiliza a los cromosomas mitóticos	Hipersensible a MMS y rayos gamma, débilmente sensible a UV y rayos X; débil o no hipersensible a mostaza nitrogenada; hembras homocigotas estériles	
<i>mus111</i> <i>mutagen-sensitive 111</i>		Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada, rayos X y gamma	
<i>mus112</i> <i>mutagen sensitive 112</i>	Causa no-disyunción moderada	Hipersensible a MMS	
<i>mus202</i> <i>mutagen-sensitive 202</i>		Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada, rayos X y UV	
<i>mus203</i> <i>mutagen-sensitive 203</i>	Reduce la recombinación en el X de hembras; aumenta la no-disyunción en meiosis I	Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada, rayos X y UV	

<i>mus208</i> <i>mutagen-sensitive 208</i>		Hipersensible a MMS, débilmente a mostaza nitrogenada y rayos gamma	
<i>mus211</i> <i>mutagen-sensitive 211</i>		Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada y rayos gamma	
<i>mus301</i> <i>mutagen-sensitive 301</i>	No-disyunción en hembras homocigotas fértiles	Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada y rayos X	
<i>mus305</i> <i>mutagen-sensitive 305</i>	No-disyunción en hembras homocigotas	Hipersensible a rayos X, MMS y mostaza nitrogenada	
<i>mus307</i> <i>mutagen-sensitive 307</i>	Síntesis de ADN reducida en células no dañadas	Hipersensible a rayos X, MMS y mostaza nitrogenada	

(4) Reparación meiótica

<i>tos</i> (=CG10387, <i>tosca</i>) <i>tosca</i>	Endonucleasa específica para líneas germinales femeninas y estados pre-celulares blastodérmicos; corrección de errores (<i>MMR</i>); recombinación meiótica; exonucleasa 5' - 3' involucrada en la reparación de <i>DSBs</i> ; inducida en profase I de meiosis		Homólogo en humanos (<i>hexonuclease 1b / hExo1</i>), ratones (<i>mFen1</i>), <i>Xenopus</i> (<i>exonuclease Exo I</i>), <i>Caenorhabditis</i> (similar to <i>XPG N-terminal domain, XPG I-region</i>), <i>S. pombe</i> (<i>rad2</i> y <i>Exo1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>DHS1</i>)
<i>mei 217</i>	Capaces de inducir empalmes intermedios de Holliday pero no la recombinación	Afectan la meiosis I en hembras; elevada no disyunción del X; sensibles a EMS	

(5) Otras proteínas y genes de *Drosophila* que están involucrados en la reparación del ADN (La mayoría solamente conocidas por la secuencia y posición cromosómica, pero no como mutantes)

Símbolo genético y nombre del gen	Función del gen	Fenotipo	Homologías, analogías y similitudes
<i>BcDNA:GM10765</i> (=CG10670)	Reparación	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>flap structure specific endonuclease 1</i>), ratones (<i>XPG</i>), <i>Xenopus</i> (<i>XPG</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>XPG IRAD2</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD27</i>)
<i>CG3008</i>	Reparación	No se conocen mutantes	Similar en humanos, <i>Caenorhabditis</i> (<i>ZK632.3</i>), <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>RIO1</i>)
<i>CG4364</i>	Reparación	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>pescadillo</i>), <i>Danio</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>hypothetical 69.9 kD protein in MIC1-SRB5 intergenic region</i>)
<i>CG6532</i>	Reparación	No se conocen mutantes	Similar en ratones (<i>Pax transcription activation domain interacting protein PTIP</i>)
<i>REV1</i> (=CG12189, <i>dREV1</i>)	Reparación	No se conocen mutantes	Similar en humanos (&agr), <i>Caenorhabditis</i> (<i>ZK675.2</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>REV1</i>)
<i>CG5375</i>	Reparación	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>unknown</i>)
<i>CG7946</i>	Reparación	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)</i>), toro, ratones (<i>Hdgf</i>) y <i>Caenorhabditis</i>
<i>fs(2)ltoPP43</i> (=CG10528) <i>female sterile(2)ltoPP43</i>	Reparación	Recesivas letales	Similar en <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>hypothetical protein YDL115c</i>)
<i>CG14318</i>	Reparación	No se conocen mutantes	
<i>CG4049</i>	Enzima de reparación del ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>KIAA0809 protein</i>), ratones, <i>Arabidopsis</i> (<i>F22013.8</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD54</i>)
<i>CG7376</i>	Enzima de reparación del ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>SWI/SNF actine regulator</i>), ratones (<i>transcription factor</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. pombe</i> (<i>DNA repair protein</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>probable membrane protein YLR247c</i>)

CG8873	Enzima de reparación del ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>KIAA0840 protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>Co2F5.7</i>) y <i>Arabidopsis</i>
<i>rad201</i> (=CG8016, <i>RAD201</i>) <i>radiation-resistant</i>	Reparación y resistencia a la radiación	Afecta a oocitos y huevos	Similar en <i>Caenorhabditis</i>
CG2871	Motora, componente del citoesqueleto	No se conocen mutantes	
CG4983	Motora, componente del citoesqueleto	No se conocen mutantes	
CG3524	Motora, biogénesis y organización del citoesqueleto	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>human chromosome-associated polypeptide (bacaman)</i>), <i>Caenorhabditis</i> , ratones (<i>SMCD</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RHC18</i>), <i>S. pombe</i> (<i>RAD18</i>)
CG6339	Biogénesis y organización del citoesqueleto	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>RAD50</i>), <i>Caenorhabditis</i> , ratones (<i>RAD50</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>RAD50</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD50</i>)
CG4078	Unión al ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>CHL1 potential helicase</i>), ratones (<i>Ercc2</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>F25H2.13</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHL1</i>)
EG:33C11.2	Helicasa, contiene un <i>DEAH-box</i> de helicasas dependientes de ATP;	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>DDX11</i>), ratones (<i>Ercc2</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>CHL1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHL1</i>)
CG4420	Unión al ADN	No se conocen mutantes	Similar en <i>S. cerevisiae</i> (<i>DDI1</i>)
CG9003	Enzima de reparación del ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>hypothetical protein M-SCF complex protein SKp2</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> (<i>Co2F5.7</i>), <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>GRR1</i>)
CG12402	Unión al ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>hypothetical protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>Co2F5.7</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>GRR1</i>)
<i>ppa</i> (=CG9952) <i>partner of paired</i>	Unión al ADN, un dominio rico en Leu	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>dj273N12.1</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> (<i>Co2F5.7</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>putative glucose-induced repressor protein</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>GRR1</i>)
CG8272	Unión al ADN y adenilato ciclasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>KIAA0840 protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>Co2F5.7</i>), <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>GRR1</i>)
CG9777	Involucrada en los procesos de desarrollo	No se conocen mutantes	
<i>spn-B</i> (=CG3325) <i>spindle B</i>	Recombinasa	Afecta la simetría que genera la polaridad durante la formación del eje dorsal	Similar en humanos, ratones (<i>Rad511</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>Arabidopsis</i> (<i>RAD57</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>dcm1</i>)
<i>RecQ4</i> (=CG7487)	Helicasa dependiente de ATP	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>RecQ-4</i>), ratones, <i>Haemophilus</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>SGS1</i>)
<i>blm</i> (=CG6920, <i>RecQ</i>) <i>bloom</i>	Helicasa dependiente de ATP, interviene en los procesos de desarrollo	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>BLM</i>), ratones (<i>mBlm</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>DNA helicase isolog</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>E. coli</i> (<i>recQ</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>SGS1</i>)
<i>RecQ5</i> (=CG4879, <i>DQ1</i> , <i>RECQE</i>) <i>homolog of RecQ</i>	Miembro de la superfamilia de RecQ helicasas; interviene en reparación y recombinación, se expresa en el ovario y embriones	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>RECQ5</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>SGS1</i>) y <i>E. coli</i> (<i>RecQ</i>)
CG3660	Helicasa y unión al ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>chromodomain helicase DNA binding protein 2</i>), ratones (<i>Chd1</i>), gallos, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHD1</i>)
<i>Chd1</i> (=CG3733, <i>dCHD1</i>) <i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein</i>	Helicasa localizada en cromosoma politémico, contiene un dominio "chromo"	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>chromodomain helicase DNA binding protein 2</i>), ratón (<i>Chd1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHD1</i>)

<i>Chd3</i> (=9594, <i>CHD3</i>)	Helicasa con <i>DEAH-box</i> y unión a la cromatina	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>chromodomain helicase DNA binding protein 4</i>), ratones (<i>Chd1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHD1</i>)
<i>Mi-2</i> (=CG8103, <i>hb-interacting protein 76, pha</i>)	Helicasa dependiente del ATP y unión al ADN	Afectan al huevo y los recesivos son letales	Similar en humanos (<i>chromodomain helicase DNA binding protein 3</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>T14G8.1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHD1, snf2</i>)
<i>Hel89B</i> (=CG4261, <i>89B helicase</i>) <i>Helicase 89B</i>	Helicasa dependiente del ATP, interviene en los procesos de desarrollo	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>TBP-associated factor 172</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>MOT1, snf2</i>)
<i>Iswi</i> (=CG8625, <i>NURF</i>) <i>Imitation SWI</i>	Subunidad 140 kD del complejo remodelador del nucleosoma (<i>nURF</i>), unión al ADN, adenosin trifosfatasa dependiente del ADN, se expresa en el embrión.	Afectan al cromosoma politénico y los recesivos son letales	Similar en humanos (<i>SNF2L1</i>), ratones (<i>Chd1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>snf2</i>)
CG3753	Semejante a helicasa y unión al ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>TBP-associated factor 172</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> (<i>Pfam (helicase C)</i>), <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>88.7 Kd helicase in cdc26-SAP155 Intergenic region</i>)
CG5899	Semejante a helicasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos, <i>Caenorhabditis</i> (<i>similar to helicase</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>FUN30</i>)
<i>Rfc3</i> (=5313)	Factor de replicación del ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos, ratones, <i>S. cerevisiae</i> (<i>RFC3</i>), <i>S. pombe</i> (<i>replication factor c subunit</i>)
<i>Rfc40</i> (=CG14999, <i>rfc, Dras2</i>) <i>Replication-factor-C 40kD subunit</i>	Factor C de replicación, contiene un dominio <i>DEAD-box</i> de helicasa ATP dependiente	Recesivos letales que afectan los discos imagales y las pupas	Similar en humanos (<i>RFC2</i>), ratones, gallos, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>RFC4</i>)
CG5931	U5 snRNP 200kD; unión al ARN y helicasa dependiente del ATP	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>U5 snRNP-specific 200Kd protein</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> , <i>Arabidopsis</i> (<i>RNA helicase</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>BRR2</i>)
CG7972	Unión al ARN y helicasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>U5 snRNP-specific 200Kd protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>G9365 ORF</i>)
CG5205	Unión al ARN y helicasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>RNA helicase</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. pombe</i> (<i>RNA helicase</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>G9365 ORF</i>)
CG10210	Unión al ARN y helicasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>helicase SK12W</i>), ratones, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>SK12 viral mRNA translation inhibitor</i>)
<i>l(2)35Df lethal (2)35Df</i>	Unión al ARN y ARN helicasa dependiente de ATP	Hembras estériles	Similar en humanos (<i>KLAA0052</i>), ratón, <i>Caenorhabditis</i> (<i>W08D2.7</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>MTR4</i>)
<i>Rpb7</i> (=CG6572) <i>DNA directed RNA pol II</i>	" <i>DNA-directed RNA polymerase II</i> " involucrado en la transcripción del promotor Pol II; transcripción acoplada a la reparación del ADN (<i>reparosoma</i>)		Homólogo en humanos (<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G</i>), frijol de soya, <i>S. cerevisiae</i> (<i>RPB7</i>)
CG12005	Factor de transcripción involucrado en el metabolismo de aminoácidos	No se conocen mutantes	

EG:52C10.6 (=CG6362) p53 (=CG10873, dp53)	Factor de transcripción Factor de transcripción y supresor de tumores; punto de verificación del ciclo celular G1/S; en respuesta al daño uno un elemento al locus <i>rpr</i> cuyo producto es p21	No se conocen mutantes No se conocen mutantes	Similar a p53 de mamíferos y humanos (DN p63 beta), <i>Loligo</i> (p53 tumor supresor homolog) y ratón (DN p63 beta)
<i>asf1</i> <i>anti-silencing factor1</i>	Regulador del ciclo celular, subunidad del factor RCAF (<i>replication-coupling assembly factor</i>), ensamblaje de nucleosomas y de cromatina del ADN replicado, reparación de DSBs	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (ASF1), <i>S. pombe</i> (yeast anti-silencing protein homolog)
<i>gt</i> (=CG7952, <i>l(1)giant</i>) <i>giant</i>	Factor de transcripción específico de la ARN polimerasa II, semejante a ornitín-descarboxilasa, se expresa en el embrión	Defectos en la cabeza y los segmentos abdominales del 5° al 7°.	Similar en humanos (<i>hepatic leukemia factor</i>), <i>Caenorhabditis</i> (similar to BZIP transcription factor), ratones (<i>Dbp</i>)
BG:DS03323.1	Factor de transcripción, reparación y movimiento	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>KIAA0963</i>) y <i>Caenorhabditis</i>
<i>su(Hw)</i> (=CG8773) <i>suppressor of Hairy wing</i>	Factor de transcripción y unión a nucleicos	Proteína de la cromatina que altera la frecuencia de DSBs; se expresa en los ovarios; contiene un motivo Zn-finger, hembras recesivas estériles	Similar en humanos (<i>R28830.2</i>), ratones (<i>Zfp2</i>) <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (hypothetical 98.9 Kd zinc finger protein in BTN1-PEP8 intergenic region)
<i>mu2</i> (=CG1960) <i>mutator 2</i>	Factor de transcripción Pax que interviene en la modificación de proteínas (<i>Pax transcription activation domain interacting protein PTIP</i>)	Mutante mutador, reparación lenta del daño por gamas, produce deficiencias terminales	Homólogo en ratones (<i>Pax transcription activation domain interacting protein PTIP</i>)
<i>Ring</i> (=CG5595, <i>dRING</i>)	Factor de transcripción con motivo Zn-finger	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>dinG</i> , <i>RNF2</i>), ratones (<i>Rnf2</i>), ratas (<i>Ring1</i>)
CG7839	Factor de transcripción	No se conocen mutantes	Similar en humanos (CCAAT-Binding factor (CBF)), ratones (<i>Cebpa-rs1</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>F23B12.7</i>), <i>S. cerevisiae</i> (probable membrane protein YDR060w)
CG10984	Factor de transcripción	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>KIAA0874 protein</i>), ratas y <i>Caenorhabditis</i>
<i>mei-218</i> (=CG8923, <i>transcript c</i>)	Factor de transcripción involucrado en el desarrollo	Organismos fértiles, inhiben mutagenesis en los primeros estadios de la oogenesis	
CG1387	Receptor involucrado en la reparación del ADN	No se conocen mutantes	
CG4851	NER	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>DNA recombination and repair protein</i>), ratones (<i>endo/exonuclease Mrel1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>Mrel1p</i>)
<i>XRCC1</i> (=CG4208)	NER	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>XRCC1</i>), ratones (<i>Xrcc1</i>) y <i>Cricetulus</i>
<i>Rad21</i>	Punto de verificación en G2/M; NER y cohesión de cromátidas hermanas mitóticas, componente de la cohesina 14:S, se expresa en embriones	No se conocen mutantes	Homólogo de <i>RAD21</i> en <i>Schizosaccaromyces</i>
EG:EG0003.3 (=CG8648)	Endonucleasa tipo <i>FaPy</i> , contiene dominios de XPG	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>FEN1</i>), ratones (<i>Fen1</i>), <i>Xenopus</i> (<i>XFEN1b</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>XPG / RAD2</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD27</i>)
CG9272	Semejante a endonucleasa III	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>endonuclease III</i>), ratones (<i>Nih1</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>YOL043c</i>)
<i>spel1</i> (=CG4215, <i>Msh2</i>) <i>spellchecker 1</i>	Corrección de errores (<i>MMR</i>), pertenece a la familia <i>MutS</i> ; interviene en la reparación y recombinación	No se conocen mutantes	Homólogo en humanos (<i>mutS-2</i>), ratones, <i>Xenopus</i> , <i>Caenorhabditis</i> (<i>MutS</i>), <i>S. cerevisiae</i> (homologue of bacterial <i>MutS</i> protein) y <i>E. coli</i> (<i>mutS</i>)

<i>Mlh1</i> (=CG11482, <i>dmlh1</i>)	Corrección de errores (<i>MMR</i>) pertenece a la familia <i>MutL</i> , bloquea la migración de las bandas en los heterodúplex recombinantes que presentan desparejamientos	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>hMLH1</i>), ratones, ratas, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>Mlh1p</i>) y <i>E. coli</i> (<i>mutL</i>)
CG2183	Corrección de errores (<i>MMR</i>)	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>hMLH1</i> gene product), ratones (<i>Ank1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>Mlh1p</i>)
<i>Pms2</i> (=CG8169, <i>Mlh2</i> , <i>dmlh-2</i>)	Corrección de errores (<i>MMR</i>), pertenece a la familia <i>MutL</i>	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>PMS2</i>), ratones (<i>Pms2</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>DNA MMR protein</i>), <i>E. coli</i> (<i>mutL</i>)
CG7003	Corrección de errores (<i>G/T</i>)	No se conocen mutantes	Similar en humanos, ratón (<i>MSH6</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>G/T MMR enzyme</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>mutS</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>MSH6</i>)
<i>DNA-ligI</i> , <i>DNA-ligII</i> <i>DNA ligase I</i> <i>DNA ligase II</i>	Ligasas (ATP)		
CG5602	Ligasa (ATP)	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>DNA ligase I</i>), ratones (<i>Lig1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>cdc9</i>)
CG1276	Ligasa (ATP)	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>Ligase IV</i> , <i>DNA</i> , <i>ATP-dependent</i>), ratones (<i>Lig1</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>C29a12.3</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>DNL4</i>), <i>S. pombe</i> (<i>dna ligase protein</i>)
CG3179	Ligando de unión o acarreador	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>KIAA0464 protein</i>) y ratas
CG17215	Receptor G en membrana plasmática, involucrado en el transporte de Zn^{2+} , confiere resistencia al estrés oxidante	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>Zinc transporter 3</i>), ratones (<i>ZnT-3</i>), ratas (<i>ZnT-2</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>oxidative stress resistance</i>)
CG5757	Timidilato cinasa involucrada en la replicación del ADN, NER y reparación de <i>SSBs</i> , así como en reparación post-replicadora	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>thymidylate kinase</i>), ratones (<i>Tmk</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>cdc8</i>)
CG15099	Cinasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>chromosome 21 open reading frame 5</i>), <i>Emeticella</i> (<i>DopAp</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>probable membrane protein YDR141c</i>)
CG2905	Señal de transducción	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>transformation / transcription domain-associated protein</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>ATM-like protein</i>), <i>Caenorhabditis</i>
CG6535	1-fosfatidilinositol 3-cinasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>ATM</i>), ratones (<i>homolog of the human Ataxia telangiectasia gene</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>TEL1</i>), <i>S. pombe</i> (<i>Tel1p</i>)
<i>Tor</i> (=CG5092, <i>l(2)k17004</i> , <i>dTor</i>) target of rapamycin	1-fosfatidilinositol 3-cinasa	Afectan a larvas, reducen la talla celular	Similar en humanos (<i>FK506 binding protein 12-rapamycin association protein 1</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>TOR2(DRR2)</i>)
<i>Pi3K59F</i> (=CG5373, <i>DmVps34</i>) <i>Phosphatidylinositol 3 kinase 59F</i>	1-fosfatidilinositol 3-cinasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>phosphatidylinositol 3 kinase, class3</i>), ratones (<i>Pik3cd</i>), ratas, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>vps34</i>)
EG:BACR7C10.2	1-fosfatidilinositol 4-cinasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>fosfatidilinositol 4-cinasa 230</i>), ratones (<i>Pik3c2g</i>), ratas, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>Stt4p: phosphatidylinositol-4-kinase</i>)

<i>Ckl1alpha</i> (=CG2028, <i>dmCK1</i>) <i>Casein kinase I</i>	Subunidad alfa de caseína cinasa I con tres dominios: Ser/Treo, cinasa ATP-uni6n y cinasa. Reparaci6n en hembras y en la embriog6nesis temprana; se activa en embriones da±ados con rayos gamma;	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>cinasa caseína I-alpha</i>), ratones, <i>Xenopus</i> (<i>cinasa CK1</i>), <i>Caenorhabditis</i> (C03C10.1), <i>S. cerevisiae</i> (HRR25)
<i>grp grapes</i>	Cinasa Ser/Treo y punto de verificaci6n en G2/M regulando a <i>p34</i> ; se expresa en el oocito; interviene en la alineaci6n de los cromosomas	Bloquean los cambios morfol6gicos y bioquímicos de la transici6n "midblastula" (MBT)	Similar en humanos (<i>CHK1</i> (<i>checkpoint</i> , <i>S. pombe</i>) homolog), ratones (<i>Chk1</i>), <i>Xenopus</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHK1</i>) <i>S. pombe</i> (<i>chk1</i> (<i>rad27</i>))
<i>wee</i> (=CG4488, <i>Dwee</i>) <i>wee</i>	Cinasa Tir con tres dominios: Ser/Treo, cinasa ATP-uni6n y cinasa y punto de verificaci6n en S/G2 dependiendo de <i>cdc2</i>	Recesivos, hembras estériles y machos fértiles; se requiere para completar las divisiones nucleares de la embriog6nesis temprana	Similar en humanos (<i>wee1</i> +), ratones (<i>Wee1</i>), <i>Platynereis</i> (anélido) (<i>wee1-like kinase</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>NRK1</i>), <i>S. pombe</i> (<i>wee1</i>)
<i>dap</i> (=CG1772, <i>CDI4</i>) <i>dacapo</i>	Cinasa inhibidora dependiente de una ciclina (<i>Cdk1</i>); punto de verificaci6n posiblemente en G1/S	Recesivos letales	Similar en humanos (<i>CDKN1A</i> , <i>CDKN1B</i>), ratas (<i>Cip1</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>TOSA6.1</i>)

(6) Proteínas y genes de *D.melanogaster* que por su homología y /o similitudes con otros organismos se supone que participan en la reparaci6n del ADN

Símbolo genético y nombre del gen	Funci6n del gen	Fenotipo	Homologías y similitudes
CG10898	7-8-dihidro-8-oxoguanina-trifosfatasa	No se conocen mutantes	Similar en <i>Caenorhabditis</i> y <i>Bacillus</i> (<i>yzgd</i>)
<i>BcDNA</i> LD08534 (=CG4584)	<i>dUTP pyrophosphatase-like</i>	No se conocen mutantes	Similar en humanos, ratas (<i>dUTPase</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>deoxyuridinetriphosphatase</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>DUT1</i>)
CG6116	Resistencia a UV	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>UV radiation resistance associated gene</i>)
BG:DS08249.3 (=CG9014)	Reparaci6n	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>hypothetical SBB103 protein</i>), ratones (<i>LNXP80</i>), <i>Caenorhabditis</i> (similar to <i>Zn finger</i>), <i>Oryctolagus</i> (<i>VIDJ recombination activating protein1</i>)
CG8128	Reparaci6n	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>antisense basic fibroblast growth factor B</i>), ratas (<i>protein GFG</i>)
CG10018	Reparaci6n	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>The ha3611 gene product is related to S. cerevisiae SNM1 protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> , <i>Arabidopsis</i> (<i>orf12</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>PSO2</i>)
CG14134 (=CT33735)	Reparaci6n	No se conocen mutantes	Similar en humanos, <i>Caenorhabditis</i> (<i>C02F5.7</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>putative glucose-induced repressor protein</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>GRR1</i>)
CG17033	Reparaci6n	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>hypothetical SBB103 protein</i>) y <i>Caenorhabditis</i> (similar to <i>Zinc finger, C3HC4 type, RING finger</i>)
<i>DDB1</i> (=DDBP1)	Se une al ADN, se postula que reconoce el da±o, interviene en NER	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>UV damaged DNA binding factor</i>), <i>Caenorhabditis</i> ; posible similitud con <i>XPE</i>
CG10489	Subunidad B de la ADN polimerasa epsilon	No se conocen mutantes	Similar en humanos, ratones (<i>Pole2</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>FO8B4.5</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>DPB2</i>), <i>S. pombe</i> (<i>putative DNA polymerase epsilon, subunit b</i>)

<i>XNP (=CG4548, xnp/atr-x)</i>	Helicasa del ADN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>zinc finger helicases</i>), ratones (<i>ATRX protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> (strong similarity to the <i>SNF2/RAD54 family of helicases</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>RAD54</i>)
<i>BcDNA:LD26519 (=CG11371)</i>	Ligando y acarreador involucrado en la replicación	No se conocen mutantes	
<i>ESTS:83E10S</i>	Semejante a ligasa del ADN (ATP)	No se conocen mutantes	Homóloga en ratones (<i>Lig1</i>)
<i>CG17540</i>	Unión al ARN	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>splicing factor (45kD)</i>), <i>Caenorhabditis</i> y <i>Arabidopsis</i> (<i>DNA damage-repair/tolerance protein DRT111 precursor</i>)
<i>Cpsf (=CG10110, dCPSF-160)</i> <i>Cleavage and polyadenylation specificity factor</i>	Corte del ARNm y factor de poliadenilación, subunidad 160kD	Recesivos letales	Similar en humanos (<i>cleavage and polyadenylation specificity factor, 160kD subunit (CPS)</i>), toros, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (probable membrane protein <i>YDR301w</i>)
<i>CG6239</i>	Factor de transcripción involucrado en la replicación	No se conocen mutantes	
<i>Tyb2 (=CG7764, TFB2)</i>	Factor de la ARN polimerasa II involucrado en el inicio de la transcripción del promotor Pol II el cual es componente del factor de transcripción TFIIF	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>general transcription factor IIF, polypeptide 4 (52kD) subunit</i>), ratones (<i>TFIIF transcription/DNA repair factor p52 subunit</i>), <i>S. cerevisiae</i> (probable membrane protein <i>YPL122c</i>)
<i>Trf2 (=CG18009, CG11195, TBP-like factor)</i> <i>TATA box binding protein-related factor 2</i>	Factor de la ARN polimerasa II involucrado en el inicio de la transcripción del promotor Pol II localizado en el cromosoma politémico	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>TBP like protein</i>), ratones (<i>transcription factor II D</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>F39H11.2</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>SPT15</i>)
<i>CG4549 (=FRAP-related)</i>	1-fosfatidilinositol 3-cinasa	No se conocen mutantes	Similar en humanos (<i>rapamycin associated protein FRAP2</i>), ratas (<i>homolog of the human ataxia telangiectasia gene</i>), <i>Caenorhabditis</i> (strong similarity to the <i>PI3 / P14 family of kinases</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>TOR2</i>)

Tabla 1. 2. Lista alfabética de los genes de *Drosophila melanogaster* involucrados en la reparación del ADN (Símbolo del gen y posición citogenética o recombinogénica)

<i>agt</i> 84A2-3	<i>mus2</i> 62B10-11	<i>Rad51D</i> (=CG6318) 17B4-5	CG5375 31D8-9
<i>asf1</i> 76B11-C1	<i>mus101</i> 12B1-7	<i>rad201</i> 45B2-3	CG5524 95E4-6
<i>BcDNA:LD08534</i> 32C5-D1	<i>mus102</i> 2B1-18	<i>RecQ4</i> (=CG7487) 66B11-13	CG5602 60A7-9
<i>BcDNA:GM10765</i> 64C12	<i>mus103</i> 5A8-2	<i>RecQ5</i> 70E6-7	CG5757 55B2-4
<i>BcDNA:LD19945</i> 8A1	<i>mus106</i> 10E2-12B7	<i>REVI</i> (=CG12189) 61C8	CG5899 30E3-F1
<i>BcDNA:LD26519</i> 21A5	<i>mus108</i> 1-10.8	<i>Rfc3</i> 31E1-2	CG5931 72B2-C1
<i>BG:DS03323.1</i> 35B7-8	<i>mus109</i> 9A2-B1	<i>Rfc40</i> 64A10	CG6116 34B1-3
<i>BG:DS08249.3</i> 34C6	<i>mus111</i> 8A1-8D9	<i>Rpb7</i> (=CG6572) 88E8	CG6239 66D6-8
<i>blm</i> 86F4-7	<i>mus112</i> 9E	<i>RpS3</i> 94F1	CG6339 58D7-E1
<i>Cdk7</i> 4F1-2	<i>mus115</i> 1-10.8	<i>Rrp1</i> 23C1-2	CG6532 70C10-11
<i>Cdk8</i> 67C2	<i>mus201</i> 29C3-4	<i>RrP0</i> 79C2-D1	CG6535 88E8-9
<i>Cdk9</i> 58F1-2	<i>mus202</i> 2-	<i>Ring</i> 98 ⁶ -8	CG7003 71B2-3
<i>Chd1</i> 23C2-3	<i>mus203</i> 2-	<i>spcl 1</i> 35A-1	CG7376 65A5-6
<i>Chd3</i> 76B3	<i>mus204</i> 2-	<i>spn-B</i> 88B7-8	CG7839 68A3
<i>Cklalpha</i> 11B14	<i>mus205</i> (=CG1923) 43E16-18	<i>Ssll</i> (=CG11115) 79F5-6	CG7946 99D5-7
<i>cpsf</i> 51A4-6	<i>mus206</i> 37A2-55A4	<i>su(Hw)</i> 88B6-7	CG7972 66B10-11
<i>CycH</i> 79A4-5	<i>mus207</i> 2-	<i>Tfb1</i> (=CG8151) 50F6	CG8128 13E12-14
<i>dap</i> 46A3-4	<i>mus208</i> 2-89	<i>Tfb2</i> 71D3-E1	CG8272 44F6-8
<i>DDb1</i> 87D11-12	<i>mus209</i> 56F11-12	<i>Thd1</i> 102C3-4	CG8873 25B7-8
<i>DNApol-epsilon</i> (=CG6768) 94F1	<i>mus210</i> 51F4-6	<i>Tor</i> 34A5	CG9003 48B2-3
<i>DNApol-eta</i> (=CG7143) 79B-2	<i>mus211</i> 2-47	<i>tos</i> 37A3-4	CG9272 38F4-5
<i>DNApol-iota</i> (=CG7602) 84F4-5	<i>mus301</i> 61F7-66D10	<i>Trf2</i> 7E3-6	CG9777 14F2-5
<i>EG:33C11.2</i> 1F2	<i>mus302</i> 73A4-86D4	<i>UbcD6</i> 82E2-3	CG10018 83B-2
<i>EG:BACR7C10.2</i> 3A9-B1	<i>mus304</i> 75B	<i>wss</i> 27C3-4	CG10210 95B7-C1
<i>EG:EG0003.3</i> 53D12-14	<i>mus305</i> 73A4-86D4	<i>XNP</i> 96E1-2	CG10489 64F3-4
<i>EG:52C10.6</i> 54E8-9	<i>mus306</i> 86D3-90E1	<i>Xpac</i> 4B1	CG10694 95D9-10
<i>Erccl</i> (=CG10215) 51D1-2	<i>mus307</i> 86D3-90E1	<i>XPD</i> 57C4-6	CG10898 86E13-14
<i>ESTS:83E10S</i> 60A	<i>mus308</i> 87C8-9	<i>XRCC1</i> 4F2-3	CG10984 69D5-E1
<i>fs(2)hoPP43</i> (=CG10528) 38A3-4	<i>mus309</i> 86E3-5	<i>CG1387</i> 7E2	CG12005 82F6-7
<i>gTP</i> 36A6-7	<i>mus310</i> 73A4-86D4	<i>CG2183</i> 44B1	CG12176 12A9-B1
<i>gt</i> 3A1	<i>mus311</i> 73A4-86D4	<i>CG2871</i> 4C10-11	CG12402 88A10

<i>hay</i> 67E3-4	<i>mus312</i> 61F7--66D10	<i>CG2905</i> 41F3	<i>CG13900</i> 61D2-4
<i>Hel89B</i> 89B2-3	<i>okr</i> 23C2-3	<i>CG3008</i> 25B4--5	<i>CG14134</i> 68C11--12
<i>Hus1-like</i> 82D5-6	<i>p53</i> 94D12--13	<i>CG3179</i> 67B9--10	<i>CG14318</i> 90C2-4
<i>Iswi</i> 49B5-7	<i>phr</i> 43E18--F1	<i>CG3660</i> 21B4--5	<i>CG15099</i> 55F3-4
<i>Ku80 (=BG:DS09217.6)</i> 35D6	<i>phr6-4</i> 38E1	<i>CG3753</i> 25B8	<i>CG17033</i> 72B2--C1
<i>l(2)35Df</i> 35D5--6	<i>Pi3K59F</i> 59E3--4	<i>CG4049</i> 60B5--7	<i>CG17215</i> 33C1--4
<i>Mat1</i> 47B7--10	<i>Pms2</i> 51F9--11	<i>CG4078</i> 5B3--6	<i>CG17227</i> 87B13--15
<i>mei9</i> 4B4--6	<i>ppa (=CG9952)</i> 58F4--6	<i>CG4364</i> 30C6--8	<i>CG14134</i> 68C11--12
<i>mei-41</i> 14C3--4	<i>Rad1</i> 23A1	<i>CG4420</i> 14C6--D1	<i>CG14318</i> 90C2-4
<i>mei-217</i> 15D6	<i>Rad9</i> 75E1--2	<i>CG4549</i> 6D2--3	<i>CG15099</i> 55F3-4
<i>mei-218</i> 15D4--E1	<i>Rad17</i> 88C10--D1	<i>CG4851</i> 32E4--F1	<i>CG17033</i> 72B2--C1
<i>Mi-2</i> 76D5--6	<i>Rad23</i> 102B3	<i>CG4983</i> 33A5--6	<i>CG17215</i> 33C1--4
<i>Mhl1</i> 44B1--2	<i>Rad51(=Dmcl, Dmrad51)</i> 99D5--7	<i>CG5205</i> 88F6--7	<i>CG17227</i> 87B13--15
<i>mrel1</i> 32E4--F1	<i>Rad51C</i> 45B2--3	<i>CG5285</i> 89F2	

En el cromosoma 4 se han localizado sólo dos genes relacionados con la reparación del ADN: *Thd1* (102C3--4) y *Rad23* (102B3). Los genes *Apl*, *AplI*, *CG17540*, *DdbP1*, *DdbP2*, *DdbP3*, *DNAIglI*, *DNAIglII*, *Rad21*, *RpA-8*, *RpA-30* y *RpA-70* y *udg* sin posición citogenética, ni recombinogénica en FlyBase, 16 febrero2001.

Tabla 1.3. Grupos epistáticos de genes de *S. cerevisiae* involucrados en la reparación del daño al ADN por radiaciones y genes mutantes similares en *D. melanogaster* (Friedberg et al., 1995; Smith and Jones, 1999).

RAD3 de levaduras	Genes mutantes similares a RAD3 en <i>Drosophila melanogaster</i>	RAD52 de levaduras	Genes mutantes similares a RAD52 en <i>Drosophila melanogaster</i>	RAD6 de levaduras	Genes mutantes similares a RAD6 en <i>Drosophila melanogaster</i>
RAD1	<i>mei9, Rad1</i>	RAD50	CG12407, CG6339	RAD6	<i>UbcD6</i>
RAD2	<i>mus201, tos</i>	RAD51	<i>Rad51</i>	RAD9	<i>Rad9</i>
RAD3	<i>mei-41</i>	RAD54	<i>okr, CG4049, XNP</i>	RAD18	CG5524
RAD4	<i>mus210</i>	RAD24	<i>Rad17</i>	REV1	REV1
RAD10	<i>Ercc1</i>			REV3 (PSO1)	<i>mus205</i>
RAD14	<i>Xpac</i>			CDC9	<i>Cdk9, CG5602, CG17227</i>
SSL1	<i>Ssl1</i>			CDC8	<i>Cdk8, CCG5757</i>
SSL2 (RAD25)	<i>hay</i>				
TFB1	<i>Tfb1</i>				
RAD23	<i>Rad23, CG10694</i>				
CDC8	<i>Cdk8, CG5757</i>				
CDC9	<i>Cdk9, CG5602, CG17227</i>				
PSO2 (SNM1)	CG10018				

Tabla 1.4. Genes de *D. melanogaster* similares a los genes de *S. cerevisiae* y humanos, cuyos productos intervienen en la formación del reparosoma (Friedberg, et al., 1995; Smith and Jones, 1999).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>rad14</i>	<i>hXPA</i>	<i>Xpac</i>
<i>rad4</i>	<i>hXPC</i>	<i>mus210</i>
<i>rad23</i>	<i>RAD23(S.cerevisiae homolog B)</i>	<i>Rad23</i>
<i>rad25/Ssl2</i>	<i>HXPB/ ERCC3</i>	<i>hay</i>
<i>rad3</i>	<i>HXPD/ ERCC2</i>	<i>XPD</i>
<i>rad1</i>	<i>hXPF</i>	<i>mei9</i>
<i>rad10</i>	<i>ERCC1</i>	<i>Ercc1</i>
<i>rad2</i>	<i>HXPG/ ERCC5</i>	<i>mus201</i>
<i>Tfb1</i>	<i>p62</i>	<i>Tfb1</i>
<i>YPL122c</i>	<i>general TFIIH polypeptide 4(52kD subunit)</i>	<i>Tfb2</i>
<i>Ssl1</i>	<i>BTF2</i>	<i>Ssl1</i>
<i>KIN28</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 7 (homolog of Xenopus MO15 cdk-activating)</i>	<i>Cdk7</i>
<i>CCL1</i>	<i>cyclin H</i>	<i>CycH</i>
<i>Tfb3</i>	<i>MAT1</i>	<i>Mat1</i>

Tabla 1. 5. Genes y mutantes involucrados en la regulación de las fases del ciclo celular G1/ S y S/ G2 (Friedberg et al., 1995)

<i>Drosophila</i> : Símbolo y nombre del gen	Función del producto: detiene el ciclo celular en un punto (por inferencia con <i>S. pombe</i>)	Fenotipo mutante en <i>Drosophila</i>	Homólogo en <i>S. pombe</i>	Otros homólogos
<i>p53</i> (=CG10873, <i>dp53</i>)	Factor de transcripción, y reparación; supresor de tumores; punto de verificación del ciclo celular G1/S; en respuesta al daño une un elemento al locus <i>rpr</i> cuyo producto es <i>p21</i> (<i>waf-1/cip-1</i>)	No se conocen mutantes	No se conoce	Similar a <i>p53</i> de mamíferos y humanos (<i>DN p63 beta</i>), <i>Loligo</i> (<i>p53 tumor suppressor homolog</i>) y ratón (<i>DN p63 beta</i>)
<i>dap</i> (=CG1772, <i>CDI4</i>) <i>dacapo</i>	Cinasa inhibidora dependiente de una ciclina (Cdk); punto de verificación en G1/S	Recesivos letales		Similar en humanos (<i>CDKN1A, CDKN1B</i>), rata (<i>Cip1</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>TOSA6.1</i>)
<i>Rad9</i> (=CG3945)	Controla el ciclo celular en el punto de verificación S/G2 y posiblemente en G1/S; supresión de tumores	No se conocen mutantes	<i>RAD9</i>	Homólogo en humanos, ratón, <i>Caenorhabditis</i> y <i>S. pombe</i> (<i>RAD9</i>)
<i>Rad1</i> (=CG3240)	Controla el ciclo celular en el punto de verificación S/G2; reparación de <i>DSBs</i>	Elimina el ADN no homólogo de los extremos 3' del ADN recombinante; no se conocen mutantes	<i>rad1</i>	Similar en humanos (<i>RAD1</i>), ratón y <i>S. pombe</i> (<i>RAD1</i>)
<i>mei-41</i> (=CG4252, <i>mei-195</i> , <i>mus103</i> , <i>mus104</i>) <i>meiotic 41</i>	Fosfatidilinositol 3-cinasa, detección del daño en el punto de verificación S/G2; se expresa en ovarios, repara rompimientos cromosómicos; recombinación de no homólogos en hembras	Sensible a cafeína, rayos X y UV; larvas hipersensibles a hidroxiaurea; carece del factor 1 de escisión; aumenta la pérdida de cromosomas meióticos y la no-disyunción	<i>rad3</i>	Análogo en humanos (<i>ATM, FRP1</i>); <i>Caenorhabditis</i> (<i>ATM-like protein</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>ESR1, tor1, tor2, tel1</i>), <i>S. pombe</i> (<i>rad3</i>)
<i>mus304</i> (=CG7347) <i>mutagen-sensitive 304</i>	Helicasa dependiente de ATP relacionada con RecQ, componente del citoesqueleto; punto de verificación en S/G2 del daño al ADN	Hipersensible a MMS, mostaza nitrogenada; no es sensible a rayos-X; sensible a la cafeína; detiene el desarrollo embrionario; parcialmente deficiente en post-replicación, y recombinación meiótica; originalmente se observó que reparaba por escisión a dímeros de pirimidina, ahora se atribuye esta reparación a la presencia del gen <i>phr</i> en esta línea	No se conoce	<i>Dugesia japonica</i> (<i>myosin heavy chain</i>), <i>E. coli</i> (<i>RecQ</i>)
<i>Rad17</i> (=CG7825)	Controla el ciclo celular en el punto de verificación S/G2; supresión de tumores		<i>rad17</i>	Homólogo en humanos (<i>RAD17</i> (<i>S. pombe</i>) <i>homolog</i>), ratón (<i>RF-C/ activator 1 homolog</i>), <i>Caenorhabditis</i> y <i>S. cerevisiae</i> (<i>checkpoint protein RAD24</i>) y <i>S. pombe</i> (<i>rad17</i>)

<i>Hus1-like (=CG2525, Hus1)</i>	Reparación y control del ciclo celular en el punto de verificación S/G2	No se conocen mutantes	<i>hus1</i>	Similar en humanos (<i>HUS1</i> (<i>S. pombe</i>) checkpoint homology), ratón, <i>Caenorhabditis</i> y <i>S. pombe</i> (<i>hus1</i>)
<i>grp grapes</i>	Cinasa Ser/Treo y punto de verificación G2/M regulando a <i>p34</i> , se expresa en el oocito; interviene en la alineación de los cromosomas	Bloquean los cambios morfológicos y bioquímicos de la transición (MBT) "midblastula" y alteran el punto de chequeo G1/S	<i>chk1 (rad27)</i>	Similar en humanos (<i>CHK1</i> (checkpoint, <i>S. pombe</i>) homolog), ratón (<i>Chk1</i>), <i>Xenopus</i> , <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>CHK1</i>) <i>S. pombe</i> (<i>chk1 (rad27)</i>)
<i>Rad21</i>	Punto de verificación en G2/M; NER y cohesión de cromátidas hermanas mitóticas, componente de la cohesina 14.S; se expresa en embriones	No se conocen mutantes	<i>RAD21</i>	Homólogo de <i>RAD21</i> en <i>S. pombe</i>
<i>mus101 (=CG11156) mutagen-sensitive 101</i>	Reparación de grupos alquilo por recombinación de no homólogos; reparación de puentes y rompimientos dobles; regula punto de verificación post-replicador G2, si el inicio de S fue deficiente	Hipersensible a MMS, acetaminofluoreno, mostaza nitrogenada, rayos X y UV, baja fertilidad; sensible a cafeína; inestabilidad cromosómica y elevada no-disyunción en hembras	<i>cut5</i>	Análogo a <i>RAD6</i> de levadura; homólogo en humanos (<i>similar to S. pombe -rad4+ /cut5+ product (A40727)</i>), ratón (<i>ect2 transforming protein</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>similar to BRCA1C terminus (BRCT) domain (4 domains)</i>)
<i>asf1 anti-silencing factor 1</i>	Regulador del ciclo celular, subunidad del factor RCAF (<i>replication-coupling assembly factor</i>), ensamblaje de nucleosomas y de cromatina del ADN replicado, reparación de <i>DSBs</i>	No se conocen mutantes	<i>Yeast anti-silencing protein homolog</i>	Homólogo en humanos, <i>Caenorhabditis</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>ASF1</i>), <i>S. pombe</i> (<i>yeast anti-silencing protein homolog</i>)
<i>CycH Cyclin H</i>	Regulador del ciclo celular; factor de transcripción de la ARN polimerasa II involucrado en el inicio de la transcripción del promotor Pol II, componente del factor TFIIF;	No se conocen mutantes	<i>CCL1</i>	Similar en humanos (<i>p37/ cyclin H</i>), ratón (<i>G1/S-specific cyclin C</i>), <i>Xenopus</i> (<i>cyclin H (MO15-associated protein (p36))</i>)
<i>Mat1</i>	Regulador del ciclo celular, factor de transcripción de la ARN polimerasa II involucrado en el inicio de la transcripción del promotor Pol II, componente del factor TFIIF; complejo con subunidades del RFIK (<i>replication-coupling assembly factor IK</i>) y reparosoma	No se conocen mutantes	No se conoce	Homólogo a <i>MAT1</i> de humanos, ratón (<i>Mat1</i>), <i>Caenorhabditis</i> (<i>similar to human cdk7/ cyclin H assembly factor</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>transcription/ repair factor TFIIF subunit Tfb3</i>)
<i>wee (=CG4488, Dwee) wee</i>	Cinasa Tir con tres dominios: Ser/Treo, cinasa ATP-unión y cinasa y punto de verificación en S/G2 dependiendo de <i>cdc2</i>	Recesivos, hembras estériles y machos fértiles; se requiere para completar las divisiones nucleares de la embriogénesis temprana	<i>wee1</i>	Similar en humanos (<i>wee1+</i>), ratón (<i>Wee1</i>), <i>Platynereis</i> (anélido) (<i>wee1-like kinase</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>NRK1</i>), <i>S. pombe</i> (<i>wee1</i>)

APÉNDICE (TABLAS DE RESULTADOS)

Tabla 3.3. Análisis estadístico de todos los experimentos con nitrato de Ca (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Tratamiento	1	5.432	5.432	15.951	<0.0001*
Ca ²⁺	4	6.786	1.697	4.982	0.0006*
MMS	1	1,513.298	1,513.298	4,443.762	<0.0001*
Sexo	1	33.026	33.026	96.980	<0.0001*
Ca ²⁺ * Sexo	4	3.879	0.970	2.848	0.0230*
MMS * Sexo	1	10.216	10.216	29.999	<0.0001*
MMS * Sexo * Tratamiento	1	1.483	1.483	4.355	0.0371*
MMS * Ca ²⁺ *Tratamiento	4	4.123	1.031	3.027	0.0170*
Residuales + interacciones no significativas	1,117	380.388	0.341		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTORES	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Ca ²⁺	B0, B2	-0.221	0.152	<.0001
	B0, B4	-0.168	0.152	0.0019
	B2, B3	0.161	0.157	0.0039
MMS	C0, C1	-2.338	0.068	<.0001
Sexo	F, M	0.340	0.068	<.0001

(*) Datos transformados arcosenh, , (*)Valores de p significativos con ANOVA factorial, (**) Valores de p significativos (<= 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni

Tabla 3.4. Análisis estadístico del total de manchas / individuo obtenidas en el pretratamiento con Ca^{2+} (48-72 h de edad larvaria) y sin MMS (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Sexo	1	4.530	4.530	11.044	0.0010*
Ca^{2+}	4	3.582	0.895	2.183	0.0712
Ca^{2+} * Sexo	4	4.808	1.202	2.930	0.0213*
Residuales	270	110.755	0.410		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Sexo	F,M	0.254	0.151	0.001

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Ca^{2+}	4	5	5	6.222	7.288	0.1832	0.1214

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Sexo	7,861.5	5	-2.861	-3.097	0.0042	0.002*

(*) Datos transformados en arcosenh, (*) Valores significativos para ANOVA factorial, Prueba de H y de U, (**) Valores de p significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦ Corregida para empates

Tabla 3.5. Análisis estadístico del total de manchas/ individuo obtenidas en el post-tratamiento con Ca^{2+} (74-120 h de edad larvaria) y sin MMS (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Ca^{2+}	4	0.175	0.044	0.133	0.9703
Sexo	1	0.200	0.200	0.606	0.4370
Ca^{2+} * Sexo	4	1.395	0.349	1.058	0.3778
Residuales	268	88.359	0.330		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p
Sexo	F,M	0.053	0.136	0.4403

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Ca^{2+}	4	5	4	0.528	0.683	0.9707	0.9534

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Sexo	9,323	4	-0.504	-0.573	0.6146	0.5667

(*) Datos transformados en arcsenh, (*) Valores significativos para Anova factorial, (**) Valores de p significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦Corregida para empates

Tabla 3.6. Análisis estadístico del total de manchas / individuo obtenidas en el pretratamiento con Ca^{2+} (48-72 h de edad larvaria) y después con MMS (72-74 h de edad larvaria). (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Ca^{2+}	4	7.199	1.800	6.119	0.0001*
Sexo	1	14.005	14.005	47.620	<.0001*
Ca^{2+} * Sexo	4	3.313	0.828	2.816	0.0260*
Residuales	241	70.878	0.294		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Ca^{2+}	B0, B1	-0.312	0.293	0.0028
	B0, B2	-0.332	0.288	0.0013
	B0, B4	-0.504	0.293	<.0001
Sexo	F,M	0.481	0.135	<.0001

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Ca^{2+}	4	5	25	14.915	14.972	0.0049	0.0048*

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	P CORREGIDA♦
Sexo	3943.0	25	-6.833	-6.846	<.0001	<.0001*

(*) Datos transformados en arcosenh, (*) Valores significativos para ANOVA factorial, Prueba de H y de U, (**) Valores de p significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦Corregida para empates

Tabla 3.7 Análisis estadístico del total de manchas / individuo obtenidas con el MMS (72-74 h de edad larvaria) y los post-tratamientos con nitrato de calcio (74-120 h de edad larvaria) (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Ca ²⁺	4	4.442	1.111	3.521	0.0079*
Sexo	1	28.031	28.031	88.865	<.0001*
Ca ²⁺ * Sexo	4	0.516	0.129	0.409	0.8024
Residuales	316	99.676	0.315		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Ca ²⁺	B0, B2	-0.314	0.281	0.0017
	B0, B3	-0.296	0.276	0.0026
Sexo	F,M	0.586	0.122	<.0001

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Ca ²⁺	4	5	25	10.859	10.906	0.0282	0.0276*

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Sexo	5,860.5	25	-8.725	-8.744	<.0001	<.0001*

(* Datos transformados en arcosh, (*) Valores significativos para ANOVA factorial, Prueba de H y de U (***) Valores de P significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦Corregida para empates

Tabla 3.8. Análisis estadístico de todos los experimentos con Pb²⁺ (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE LOS CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Tratamiento	1	9.673	9.673	24.485	<0.0001*
Pb ²⁺	4	2.317	0.579	1.466	0.2103
MMS	1	1,219.127	1,219.127	3,085.97	<0.0001*
Sexo	1	32.566	32.566	82.434	<0.0001*
Tratamiento* Pb ²⁺	4	9.693	2.423	6.133	<0.0001*
Pb ²⁺ * Sexo	4	6.534	1.634	4.134	0.0025*
MMS * Sexo	1	12.732	12.732	32.228	<0.0001*
Pb ²⁺ * MMS *	4	7.824	1.956	4.951	0.0006*
Tratamiento					
Pb ²⁺ * MMS *	4	5.521	1.38	3.493	0.0076*
Sexo					
Residuales + interacciones no significativas	1,151	454.708	0.395		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTORES	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Tratamiento	A1, A2	0.220	0.072	<.0001
MMS	C0,C1	-2.088	0.072	<.0001
Sexo	F,M	0.338	0.072	<.0001

(*) Datos transformados en arcosenh, (*) Valores significativos para ANOVA factorial (**) Valores de p significativos (< 0.05/número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni

Tabla 3.9. Análisis estadístico del total de manchas/individuo obtenidas en el pretratamiento con Pb²⁺ (48-72 h de edad larvaria) sin MMS (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Pb ²⁺	4	2.329	0.582	1.530	0.1934
Sexo	1	2.155	2.155	5.663	.0180*
Pb * Sexo	4	1.464	0.366	0.962	0.4285
Residuales	285	108.429	0.380		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE P**
Sexo	F,M	0.171	0.141	0.018

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Pb ²⁺	4	5	5	4.404	5.141	.3541	.2731

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Sexo	9371	5	-2.053	-2.218	.040	.0265*

(*) Datos transformados en arcosenh, (*) Valores significativos para ANOVA factorial, Prueba de H y de U, (**) Valores de P significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦Corregida para empates.

Tabla 3.10. Análisis estadístico del total de manchas / individuo obtenidas en el post-tratamiento con Pb²⁺ (74-120 h de edad larvaria) sin MMS (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Pb ²⁺	4	1.040	0.260	0.820	0.5135
Sexo	1	0.474	0.474	1.495	0.2225
Pb ²⁺ * Sexo	4	2.345	0.586	1.849	0.1197
Residuales	273	86.56	0.317		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Sexo	F,M	0.071	0.132	0.2884

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Pb ²⁺	4	5	4	2.175	2.878	0.7037	0.5785

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Sexo	9451.5	4	-0.813	-0.935	0.4163	0.3498

(*) Datos transformados en arcosenh, (**) Valores de P significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦Corregida para empates

Tabla 3.11. Análisis estadístico del total de manchas/individuo obtenidas en el pretratamiento con Pb²⁺ (48-72 h de edad larvaria) y con MMS (72-74 h de edad larvaria), (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Pb ²⁺	4	11.222	2.805	8.797	<.0001*
Sexo	1	21.810	21.810	68.391	<.0001*
Pb ²⁺ * Sexo	4	8.714	2.179	6.832	<.0001*
Residuales	255	81.319	0.319		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Pb ²⁺	B1, B2	0.385	0.316	.0007
	B2, B3	-0.398	0.337	.0009
Sexo	F, M	0.525	0.137	<.0001

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA*	p	p CORREGIDA*
Pb ²⁺	4	5	22	8.587	8.633	.0723	.071

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA*	p	p CORREGIDA*
Sexo	4301	22	-7.177	-7.196	<.0001	<.0001*

(*) Datos transformados en arcosenh para Anova y Bonferroni/Dunn., (*) Valores significativos para ANOVA factorial, Prueba de H y de U, (**) Valores de P significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, *Corregida para empates

Tabla 3.12. Análisis estadístico del total de manchas/individuo obtenidas con el MMS (72-74 h de edad larvaria) y los post-tratamientos con Pb²⁺ (74-120 h de edad larvaria), (incluye a testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Pb ²⁺	4	6.030	1.508	2.617	0.0355*
Sexo	1	18.121	18.121	31.453	<0.0001*
Pb ²⁺ * Sexo	4	3.115	0.779	1.351	0.2512
Residuales	273	157.283	0.576		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Pb ²⁺	B2, B4	0.466	0.423	.0020
Sexo	F,M	0.523	0.178	<.0001

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Pb ²⁺	4	5	20	6.696	6.727	0.1529	0.1510

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Sexo	4802.5	20	-7.556	-7.573	<.0001	<.0001*

(*) Datos transformados en arcosenh, (*) Valores significativos para ANOVA factorial, Prueba de H y de U
 (**) Valores de P significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦Corregida para empates

Tabla 3.13. Análisis estadístico del total de manchas / individuo obtenidas en el testigo positivo MMS.

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
MMS	1	238.967	238.967	1309.854	<.0001*
Sexo	1	0.636	0.636	3.487	.0671
MMS * Sexo	1	0.636	0.636	3.487	.0671
Residuales	56	10.217	.182		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
MMS	C1, C5	-3.991	0.221	<.0001
Sexo	F, M	0.206	0.221	.0671

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA*	P	P CORREGIDA*
MMS	0.000	9	-6.653	-6.754	<0.0001	<0.0001*
Sexo	350.00	9	-1.478	-1.501	0.1393	0.1334
Sexo (Agua)	112.5	3	0.000	0.000	>0.9999	>0.9999
Sexo (MMS)	12.5	6	-4.148	-4.152	<0.0001	<0.0001

(*) Datos transformados en arcosenh, (**) Valores de p significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, *Corregida para empates

Tabla 3.14. Análisis estadístico del total de manchas / individuo obtenidas en el testigo positivo uretano

TABLA DE ANOVA*

FACTORES	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
Uretano	3	36.074	12.025	27.554	<.0001*
Sexo	1	3.219	3.219	7.377	0.0077*
Uretano * Sexo	3	1.600	0.533	1.222	0.3052
Residuales	112	48.876	0.436		

MÉTODO DE BONFERRONI / DUNN*

FACTOR	MEDIAS COMPARADAS	DIFERENCIA ENTRE MEDIAS	DIFERENCIA CRÍTICA	VALOR DE p**
Uretano	C1, C2	-0.936	0.458	<.0001
	C1, C3	-1.03	0.458	<.0001
	C1, C4	-1.515	0.458	<.0001
	C2, C4	-0.578	0.458	<.0010
	C3, C4	-0.485	0.458	<.0053
Sexo	F, M	0.328	0.239	0.0077

PRUEBA DE H (KRUSKAL-WALLIS)***

FACTOR	G.L.	GRUPOS	EMPATES	H	H CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Uretano	3	4	9	45.690	47.153	<0.0001	<.0001*

PRUEBA DE U (WILCOXON-MANN-WHITNEY)***

FACTOR	U	EMPATES	Z	Z CORREGIDA♦	p	p CORREGIDA♦
Sexo	1404.50	9	-2.076	-2.109	0.0379	0.035*

(*) Datos transformados en arcosenh, (**) Valores de P significativos (< 0.05/ número de comparaciones) con la corrección de Bonferroni, (***) Prueba de dos colas, ♦Corregida para empates

Tabla 3.15. Promedios o medias de los rangos de manchas totales/individuo / sexo en las series de tratamientos con Ca²⁺ o Pb²⁺, con y sin MMS, de acuerdo con la prueba de U (Wilcoxon-Mann-Whitney)

PRETRATAMIENTO

	SIN MMS				CON MMS			
	HEMBRAS	N	MACHOS	N	HEMBRAS	N	MACHOS	N
Ca ²⁺	154.346*	140	126.654*	140	157.943*	123	95.305*	128
Pb ²⁺	158.372*	145	137.973*	150	166.662*	133	99.083*	132

POSTRATAMIENTO

	SIN MMS				CON MMS			
	HEMBRAS	N	MACHOS	N	HEMBRAS	N	MACHOS	N
Ca ²⁺	141.928	139	137.072	139	209.046*	163	117.954*	163
Pb ²⁺	145.94	142	138.032	141	177.606*	146	104.055*	137

* Diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 3.16. Promedios o medias de los rangos de manchas totales/individuo de la interacción MMS * Sexo de acuerdo con el método de Bonferroni/Dunn

MMS	N	0 mM (EE)	N	1.2 Mm (EE)
HEMBRAS	15	.533 (.192)	15	51.667 (2.223)
MACHOS	15	.533 (.192)	15	34.600 (2.011)

(EE) error estándar

Tabla 3.17. Promedios o medias de los rangos de manchas totales/individuo de la interacción Uretano* Sexo de acuerdo con el método de Bonferroni/Dunn*

URETANO	N	0 mM (EE)	N	5mM (EE)	N	10mM (EE)	N	20 mM (EE)
HEMBRAS	15	0.533 (.192)	15	3.0 (.640)	15	2.6 (.321)	15	5.533 (.631)
MACHOS	15	0.533 (.192)	15	1.8 (.355)	15	2.267 (.452)	15	2.667 (.347)

(EE) error estándar

Tabla 3.18. Tamaño del clon *mwh* en donde se registró la frecuencia más alta de manchas por individuo después de los tratamientos con nitrato de calcio

	0 mM s/m	0 mM	0.1 mM	0.5 mM	1.0 mM
PRETRATAMIENTO					
Ca ²⁺	1	1	1	1	1
Ca ²⁺ con MMS	5-8	9-16	9-16	9-16	5-8, 9-16
POSTRATAMIENTO					
Ca ²⁺	1	2	2	1	2
Ca ²⁺ con MMS	5-8	3-4	9-16	5-8	5-8, 9-16

Tabla 3.19. Tamaño del clon *mwh* en donde se registró la frecuencia más alta de manchas por individuo después de los tratamientos con nitrato de plomo

PRETRATAMIENTO	0 mM s/m	0 mM	0.1 mM	0.5 mM	1.0 mM
Pb ²⁺	1	1	1	1	1
Pb ²⁺ con MMS	5-8	9-16	5-8	5-8	9-16
POST-TRATAMIENTO					
Pb ²⁺	1	1	1	1	1
Pb ²⁺ con MMS	5-8	9-16	5-8	5-8	5-8

Tabla 3.20. Tamaño del clon *mwh* en donde se registró la frecuencia más alta de manchas por individuo después de los tratamientos con MMS y uretano

MMS	0 mM	1.2 mM		
	1 y 2 céls.	3-4 céls.		
URETANO	0 mM	5 mM	10 mM	20 mM
	1 y 2 céls.	1 cél.	1 cél.	1 cél.

Tabla 3.21. Distribución del tamaño de los clones *mwh* en los individuos sometidos a los tratamientos con nitrato de calcio

	0 mM s/m	0 mM	0.1 mM	0.5 mM	1.0 mM
Pretrat. Ca ²⁺	1 a 33-64	1 a 128	1 a 128	1 a 33-64	1 a 5-8
Post-trat. Ca ²⁺	1 a 33-64	1 a 9-16	1 a 33-64	1 a 17-32	1 a 9-16
Pretrat. Ca ²⁺ con MMS (12 mM)	1 a 33-64	1 a 256	1 a -256	1 a -256	1 a -128
Post-trat. Ca ²⁺ con MMS (12 mM)	1 a 33-64	1 a -128	1 a -256	1 a -128	1 a -256

Tabla 3.22. Distribución del tamaño de los clones *mwh* en los individuos sometidos a los tratamientos con nitrato de plomo

	0 mM s/m	0 mM	0.1 mM	0.5 mM	1.0 mM
Pretrat. Pb ²⁺	1 a 33-64	1 a 9-16	1 a 9-16	1 a 256	1 a 9-16
Post-trat. Pb ²⁺	1 a 33-64	1 a 5-8	1 a 17-32	1 a 17-32	1 a 17-32
Pretrat. Pb ²⁺ con MMS (12 mM)	1 a 33-64	1 a -256	1 a -128	1 a >256	1 a -256
Post-trat. Pb ²⁺ con MMS (12 mM)	1 a -128	1 a -256	1 a -256	1 a -256	1 a -256

Tabla 3.23. Distribución del tamaño de los clones *mwh* en los individuos sometidos a los tratamientos con MMS y uretano

	0 mM	1.2 mM		
MMS	1 a 17-32	1 a -128		
	0 mM	5 mM	10 mM	20 mM
URETANO	1 a 17-32	1 a 17-32	1 a -128	1 a 5-8

Tabla 3.24 Análisis estadístico de los experimentos con Ca^{2+} (se excluyeron a los testigos con manipulación mínima (c/mm))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES E INTERACCIONES	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
(C) MMS	1	1239.580	1239.580	3718.196	<.0001
(D) Sexo	1	27.557	27.557	82.660	<.0001
(A) Tratamiento	1	6.468	6.468	19.400	<.0001
(B) Ca(NO ₃) ₂	3	.864	.288	.864	.4593
(C) MMS * (D) Sexo	1	5.344	5.344	16.028	<.0001
(C) MMS * (A) Tratamiento	1	.145	.145	.435	.5097
(C) MMS * (B) Ca(NO ₃) ₂	3	.386	.129	.386	.7632
(D) Sexo * (A) Tratamiento	1	.087	.087	.261	.6098
(D) Sexo * (B) Ca(NO ₃) ₂	3	3.761	1.254	3.760	.0106
(A) Tratamiento * (B) Ca(NO ₃) ₂	3	.157	.052	.157	.9252
(C) MMS * (D) Sexo * (A) Tratamiento	1	1.501	1.501	4.503	.0341
(C) MMS * (D) Sexo * (B) Ca(NO ₃) ₂	3	1.502	.501	1.502	.2125
(C) MMS * (A) Tratamiento * (B) Ca(NO ₃) ₂	3	4.111	1.370	4.111	.0066
(D) Sexo * (A) Tratamiento * (B) Ca(NO ₃) ₂	3	1.796	.599	1.796	.1464
(C) MMS * (D) Sexo * (A) Tratamiento * (B) Ca(NO ₃) ₂	3	1.418	.473	1.418	.2360
Residuales	870	290.043	.333		

Tabla 3.25. Análisis estadístico de los experimentos con Pb^{2+} (se excluyen a los testigos con manipulación mínima c/mm (B0))

TABLA DE ANOVA*

FACTORES E INTERACCIONES	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE p
(C) MMS	1	950.255	950.255	2347.327	<.0001*
(D) Sexo	1	27.248	27.248	67.309	<.0001*
(A) Tratamiento	1	11.192	11.192	27.646	<.0001*
(B) Pb(NO3)2	3	2.241	.747	1.845	.1373
(C) MMS * (D) Sexo	1	7.248	7.248	17.904	<.0001*
(C) MMS * (A) Tratamiento	1	4.108E-4	4.108E-4	.001	.9746
(C) MMS * (B) Pb(NO3)2	3	3.376	1.125	2.780	.0401*
(D) Sexo * (A) Tratamiento	1	.352	.352	.868	.3517
(D) Sexo * (B) Pb(NO3)2	3	6.442	2.147	5.304	.0013*
(A) Tratamiento * (B) Pb(NO3)2	3	7.864	2.621	6.475	.0002*
(C) MMS * (D) Sexo * (A) Tratamiento	1	.008	.008	.020	.8873
(C) MMS * (D) Sexo * (B) Pb(NO3)2	3	4.259	1.420	3.507	.0150*
(C) MMS * (A) Tratamiento * (B) Pb(NO3)2	3	7.777	2.592	6.404	.0003*
(D) Sexo * (A) Tratamiento * (B) Pb(NO3)2	3	3.645	1.215	3.001	.0298*
(C) MMS * (D) Sexo * (A) Tratamiento * (B) Pb(NO3)2	3	2.230	.743	1.837	.1389
Residuales	905	366.366	.405		

(*) $p < 0.05$

Tabla 3.26. ANOVA para número de manchas totales/individuo (datos transformados en arcoseno(h_y)) en los testigos con manipulación mínima (B0) y los paralelos (B1) para las series de tratamientos en que se probaron los efectos del Ca y del Pb

Factores y niveles	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de p
(A) Tratamiento	1	4.873	4.873	14.359	.0002*
(B) Manipulación	1	2.687	2.687	7.919	.0050*
(C) MMS	1	1161.669	1161.669	3423.192	<.0001*
(D) Sexo	1	23.743	23.743	69.966	<.0001*
(Ca,Pb) Series	1	.765	.765	2.255	.1335
(A) Tratamiento * (B) Manipulación	1	3.516	3.516	10.362	.0013*
(A) Tratamiento * (C) MMS	1	.030	.030	.087	.7676
(A) Tratamiento * (D) Sexo	1	.052	.052	.154	.6948
(A) Tratamiento * (Ca,Pb) Series	1	.748	.748	2.203	.1381
(B) Manipulación * (C) MMS	1	.924	.924	2.723	.0992
(B) Manipulación * (D) Sexo	1	.037	.037	.110	.7400
(B) Manipulación * (Ca,Pb) Series	1	.229	.229	.676	.4112
(C) MMS * (D) Sexo	1	11.336	11.336	33.406	<.0001*
(C) MMS * (Ca,Pb) Series	1	.799	.799	2.354	.1253
(D) Sex * (Ca,Pb) Series	1	3.038E-4	3.038E-4	.001	.9761
(A) Tratamiento * (B) Manipulación * (C) MMS	1	.007	.007	.022	.8827
(A) Tratamiento * (B) Manipulación * (D) Sexo	1	.345	.345	1.018	.3132
(A) Tratamiento * (B) Manipulación * (Ca,Pb) Series	1	.523	.523	1.543	.2145
(A) Tratamiento * (C) MMS * (D) Sexo	1	2.476	2.476	7.295	.0070*
(A) Tratamiento * (C) MMS * (Ca,Pb) Series	1	.068	.068	.202	.6535
(A) Tratamiento * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series	1	.269	.269	.791	.3739
(B) Manipulación * (C) MMS * (D) Sexo	1	3.354	3.354	9.883	.0017*
(B) Manipulación * (C) MMS * (Ca,Pb) Series	1	.303	.303	.893	.3450
(B) Manipulación * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series	1	.007	.007	.019	.8898
(C) MMS * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series	1	.054	.054	.160	.6890
(A) Tratamiento * (B) Manipulación * (C) MMS * (D) Sexo	1	1.022	1.022	3.011	.0830
(A) Tratamiento * (B) Manipulación * (C) MMS * (Ca,Pb) Series	1	.001	.001	.002	.9623
(A) Tratamiento * (B) Manipulación * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series	1	.287	.287	.846	.3580
(A) Tratamiento * (C) MMS * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series	1	.101	.101	.299	.5846
(B) Manipulación * (C) MMS * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series	1	.046	.046	.136	.7128
(A) Tratamiento * (B) Manipulación * (C) MMS * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series	1	.122	.122	.360	.5486
Residuales	924	313.562	.339		

Tabla 3.27. Medias aritméticas del ANOVA para las manchas totales/individuo entre los testigos con manipulación mínima (B0) y paralelos (B1)

Efecto: (A) Tratamiento * (C) MMS * (D) Sexo * (Ca,Pb) Series * (B) Manipulación

Tratamientos	Moscas	Manchas totales / individuo	± Error estándar
A1, C0, F, Ca, B0	28	.679	± .171
A1, C0, F, Ca, B1	28	1.071	± .199
A1, C0, F, Pb, B0	29	.655	± .167
A1, C0, F, Pb, B1	29	1.241	± .220
A1, C0, M, Ca, B0	28	.571	± .149
A1, C0, M, Ca, B1	28	.464	± .096
A1, C0, M, Pb, B0	30	.533	± .124
A1, C0, M, Pb, B1	30	.667	± .168
A1, C1, F, Ca, B0	27	10.926	± .859
A1, C1, F, Ca, B1	27	11.444	± .995
A1, C1, F, Pb, B0	29	10.655	± .826
A1, C1, F, Pb, B1	27	11.741	± .889
A1, C1, M, Ca, B0	28	5.929	± .623
A1, C1, M, Ca, B1	28	10.107	± 1.044
A1, C1, M, Pb, B0	33	5.848	± .573
A1, C1, M, Pb, B1	31	8.677	± 1.047
A2, C0, F, Ca, B0	28	.536	± .158
A2, C0, F, Ca, B1	28	.607	± .139
A2, C0, F, Pb, B0	28	.536	± .158
A2, C0, F, Pb, B1	39	.436	± .103
A2, C0, M, Ca, B0	28	.643	± .138
A2, C0, M, Ca, B1	28	.464	± .150
A2, C0, M, Pb, B0	29	.655	± .134
A2, C0, M, Pb, B1	39	.385	± .094
A2, C1, F, Ca, B0	33	10.606	± .772
A2, C1, F, Ca, B1	33	12.667	± .875
A2, C1, F, Pb, B0	31	9.839	± .749
A2, C1, F, Pb, B1	29	9.655	± .905
A2, C1, M, Ca, B0	33	6.061	± .612
A2, C1, M, Ca, B1	33	6.939	± .628
A2, C1, M, Pb, B0	30	5.533	± .577
A2, C1, M, Pb, B1	27	5.481	± .573