



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE INVERSIONES MÚLTIPLES EN LA
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA GENOTÓXICA DE
Drosophila melanogaster.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

VÍCTOR GARCÍA MARTÍNEZ

Tutora: Dra. Patricia Ramos Morales

2006





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE CHILE
Santiago

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Participación de inversiones múltiples en la modulación de la respuesta genotóxica de Drosophila melanogaster"

realizado por Víctor García Martínez

con número de cuenta 098546721, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Propietario

Dra. Cristina Silvia Zepeda Cisneros

Suplente

M. en C. Bertha Molina Álvarez

Suplente

M. en C. José Armando Muñoz Moya

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

García
Martínez
Víctor
56 22 51 94
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
098546721

2. Datos del tutor

Doctora
Patricia
Ramos
Morales

3. Datos del sinodal 1

Doctora
Regina Dorinda
Montero
Montoya

4. Datos del sinodal 2

Doctora
Cristina Silvia
Zepeda
Cisneros

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Bertha
Molina
Alvarez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
José Armando
Muñoz
Moya

7. Datos del trabajo escrito

Participación de inversiones múltiples en la modulación de la respuesta genotóxica de *Drosophila melanogaster*
50 p
2006

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Víctor y Guadalupe por todo el apoyo, la educación y amor que me dieron durante tantos años.

A la Dra. Patricia Ramos por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por compartir sus conocimientos conmigo y por toda su paciencia y apoyo. Gracias Paty.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que fueron parte muy importante en la realización de esta tesis por compartir sus conocimientos y experiencia en el manejo de la mosca y por sus valiosos comentarios y amistad: Adriana, Armando, Hugo Rivas, Blanca, María de Jesús, Pp, Hugo Alberto, Dorian, Diana.

A mis amigos Miguel, Rodrigo, Perla con quienes compartí las aulas durante varios semestres, por su amistad y apoyo.

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto PAPIME: EN206803, DGAPA, UNAM. El material biológico utilizado fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

ÍNDICE

Resumen.....	4
I. Introducción.....	6
Recombinación.....	6
Reparación.....	7
Inversiones.....	8
Cromosomas Balanceadores.....	11
Compuestos.....	14
Metilmetano Sulfonato.....	14
Colchicina.....	15
Azida de Sodio.....	15
Cianato de Sodio.....	16
Talidomida.....	16
Mitomicina C.....	17
Objetivo.....	17
Hipótesis.....	17
II. Material y Método.....	18
III. Resultados.....	22
IV. Discusión.....	26
V. Conclusiones.....	32
VI. Referencias.....	33
Anexo1.....	44

RESUMEN

Los balaceadores son cromosomas complejos cuya secuencia normal está alterada debido a múltiples arreglos comúnmente inducidos por la exposición de organismos a mutágenos como la radiación o a agentes químicos. Las inversiones pueden ocurrir en un mismo cromosoma (inversiones) o en diferentes cromosomas (transposiciones) y son diseñados para mantener intacto a un segmento de un cromosoma o al cromosoma completo en una cruce o "stock". El propósito de estos cromosomas es el evitar la recombinación con su cromosoma homólogo de secuencia normal y, como consecuencia, que ambos tipos de cromosomas se hereden a través de las generaciones como unidades intactas.

La presencia de inversiones impide que ocurra una sinápsis lineal normal entre los homólogos durante la meiosis y por lo tanto no se recuperan eventos derivados de recombinación genética (por lo que se considera que son supresoras de recombinación). Sin embargo, la presencia de las inversiones también traen consigo otros efectos derivados de la nueva posición de los genes en el genoma, del orden de los genes que están implicados en la inversión (lo que puede ser ventajoso o desventajoso para el organismo portador), de la expresión de los genes que puede incluso verse interrumpida si el sitio de ruptura está dentro del gen.

En el presente trabajo se analizó el índice de sobrevivencia y la proporción de fenotipos de tres líneas de moscas distintas expuestas a mutágenos de referencia con diferentes mecanismos de acción: la línea *Basc*, que presenta la inversión denominada *Basc* en condición homocigótica para las hembras y hemicigótica para los machos; la línea FM7 que porta dos genes recesivos, *mei9^a* y *mei41*, que generan deficiencia en la capacidad de reparar el daño genético mediante escisión y recombinación homóloga, respectivamente, por lo que se hace necesario la presencia del cromosoma balaceador del cromosoma X, FM7, de manera que la línea se mantenga estable; como testigo de línea se utilizaron moscas de tipo silvestre de la cepa Canton-S.

Los resultados obtenidos de este trabajo muestran que en cinco de los seis compuestos utilizados (talidomida, cianato de sodio, metilmetano sulfonato, colchicina y mitomicina C) el índice de sobrevivencia de las líneas silvestre y *Basc* fue similar en todas las concentraciones y cercano a su grupo testigo y para el caso de azida de sodio, que resultó ser un compuesto más tóxico, todas las líneas de sobrevivencia de las moscas tratadas siguen una curva similar. El índice de sobrevivencia de la línea

FM7 muestra una respuesta diferente a las otras dos líneas siendo mayor pero no significativo para los tratamientos con talidomida, cianato de sodio y metilmetano sulfonato; mientras que en los tratamientos con mitomicina C y colchicina el índice de sobrevivencia de esta línea fue menor.

El cambio en el orden de los genes interfiere con la genotoxicidad, especialmente si el metabolismo del organismo relacionado con la activación/desactivación del mutágeno depende o se asocia con alguno(s) de los genes que han cambiado de localización. La presencia de cromosomas invertidos también modifica la genotoxicidad de un compuesto, especialmente cuando el cromosoma con inversiones múltiples (cromosoma balanceador) se encuentra en heterocigosis, finalmente, la interacción del cambio en el orden de los genes, con la presencia de genes detrimentales, modifica de manera importante la genotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

Recombinación

La recombinación genética es uno de los procesos que aportan variabilidad a los seres vivos. Las evidencias citológicas del intercambio fueron descritas en el mismo año en la mosca de la fruta por John Cairns (1936) y en el maíz por Bárbara McClintok (1936). Para que el intercambio ocurra, los cromosomas homólogos replicados se aparean o sinapsan; esta cercanía se considera esencial para que el intercambio se realice entre regiones homólogas de los cromosomas. Además del azar, el intercambio de fragmentos de cromosomas en cada tétrada contribuye a que el contenido genético de las células sexuales de un organismo pueda ser muy heterogéneo. En términos generales este proceso es similar en todos los organismos con reproducción sexual, aunque se pueden identificar variantes entre especies relacionadas y aún entre las hembras y los machos de la misma especie. Por ejemplo, en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, la hembra presenta una meiosis denominada quiasmática (porque en las células meióticas en profase se pueden observar quiasmas en las tétradas), sin embargo en los machos de *Drosophila* no se observan estas estructuras, además de que no se detecta recombinación genética en sus células sexuales (meiosis aquíasmática). Un caso similar se observa en el gusano de seda, *Bombix mori*, pero en este organismo es la hembra la que muestra meiosis aquíasmática. Si bien parece que estos organismos constituyen excepciones, lo que en realidad sucede es que no se cuenta con información suficiente en otros organismos que permita establecer la frecuencia con la que se encuentran en la naturaleza diferencias similares entre géneros (Klug y Cummings, 2000).

El proceso de entrecruzamiento requiere de la rotura y unión de cadenas de ADN en los cromosomas homólogos, por lo que la complementariedad entre las cadenas de ADN y la participación de una serie de enzimas que dirigen este proceso son dos elementos importantes en este proceso (Russell, 1998).

En 1936, Curt Stern mostró que, aunque muy raro, el proceso de intercambio ocurre también en la mitosis de *Drosophila*. Se consideró un evento excepcional debido a que aun cuando en *Drosophila* y en ciertos hongos tal evento parece ser la regla, en otros organismos no se ha establecido qué arreglo guardan los cromosomas durante la interfase (Klug y Cummings, 2000).

La recombinación mitótica se da en ambos sexos con una frecuencia similar y entre cromosomas homólogos y puede ocurrir ya sea en células somáticas, donde sus productos pueden ser visibles como mosaicos somáticos, ó en células germinales precursoras, lo que trae como resultado que se puedan recobrar gametos recombinantes (previo a la meiosis) siendo este el mecanismo presente en los machos de *Drosophila* (Ashburner 1989).

Reparación

El ADN es vulnerable a diversos tipos de errores y lesiones que conducen a mutaciones génicas, cuyo efecto puede ser contrarrestado o eliminado a través de diversos sistemas de reparación del ADN (Klug y Cummings, 1999). En el caso de *Drosophila melanogaster* se han identificado dos genes que participan en la reparación del ADN: *mei9^o* y el gen *mei41^{DS}*, los cuales forman parte de la línea de moscas FM7 utilizada en este trabajo (Lindsley y Zimm, 1992; Rivas 1999).

En la reparación por escisión, una endonucleasa que corta los enlaces fosfodiéster, reconoce y escinde enzimáticamente a la deformación, generando un hueco en una de las cadenas de la hélice. La DNA polimerasa I rellena dicho hueco insertando desoxirribonucleótidos complementarios a los de la cadena intacta y finalmente, una ligasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster para unir los extremos adyacentes al sitio de reparación de la lesión, con lo cual se restituye la continuidad de la hélice (Klug y Cummings, 2000).

El proceso de la reparación por escisión puede activarse en respuesta a cualquier lesión en el ADN que deforme la hélice. Por ejemplo, un sitioapurínico se genera por la pérdida de una base nitrogenada, generalmente una guanina o una adenina al romperse el enlace glucosídico que une el 1'-C de la desoxirribosa y el 9-N del anillo de la purina. Otras enzimas reconocen bases emparejadas incorrectamente y estimulan su reparación, como las DNA glucosilasas que identifican la presencia de uracilo que puede conducir a una mutación por transición (Klug y Cummings, 2000). Una mutación en el gen *mei9^o* bloquea este tipo de reparación porque interrumpe la formación de la incisión lo que provoca que la lesión permanezca en la cadena de ADN (Rivas, 1999).

En el caso de la reparación por recombinación se considera que ésta responde a la presencia de las lesiones en el ADN que no han sido reparadas y que interrumpen el proceso de replicación. Cuando una cadena de ADN que tiene una lesión se está replicando, la DNA polimerasa interrumpe su actividad en el sitio de la lesión y la reanuda después de ésta, creando un hueco en la cadena recién sintetizada. En el caso de lesiones de doble hebra, la proteína RecA dirige un proceso de intercambio recombinacional en el que se rellena un hueco por inserción de un segmento de la cadena homóloga, incorporado por recombinación, lo que crea, a su vez, un hueco en esta segunda cadena que es relleno mediante síntesis reparadora al proseguir la replicación (Klug y Cummings, 2000). Cuando ocurre una mutación en el gen *mei41^{D5}* la lesión no sería detectada ni reparada (Rivas, 1999).

Inversiones

Los rompimientos y reuniones de DNA pueden alterar la secuencia o arreglo cromosómico estándar, dando origen a nuevos arreglos, entre los que se encuentran: deficiencias, duplicaciones, inversiones, cromosomas en anillo, translocaciones y transposiciones (Lindsley y Zimm, 1992).

Las inversiones son aberraciones intracromosómicas en las que el orden de los genes está modificado de manera que la orientación de la secuencia implicada es contraria a la que se observa en un mapa, ya sea citológico o genético (Lindsley y Zimm, 1992).

Las inversiones no implican pérdida de información, pero sí cambio en el orden de los genes de una región y si la ruptura ocurre en un gen, puede inactivarse y haber pérdida de función o puede haber efecto de posición. El efecto de una inversión es que el orden de los genes de la región involucrada aparece como si hubiera girado 180° sobre sí mismo; es una reordenación lineal de la secuencia del cromosoma. Para que una inversión se forme, se requiere que en el cromosoma ocurran dos rompimientos, ya sean inducidos con radiaciones o con agentes químicos, y que posteriormente se unan para dar continuidad al segmento invertido (Klug y Cummings, 2000). Este tipo de aberraciones también ocurren de manera natural en las poblaciones de *Drosophila* siendo más comunes las paracéntricas o inversiones que no incluyen al centrómero, con más de 320 inversiones diferentes, aunque solo siete de éstas son más comunes (Ashburner, 1989).

Las inversiones fueron descubiertas debido a sus efectos en la recombinación genética (supresoras de recombinación). Si solo uno de los miembros del par de cromosomas homólogos tiene un segmento invertido, en la meiosis no ocurrirá la sinapsis lineal normal y, en cambio, los cromosomas adoptan diversos arreglos, de manera que se logre el apareamiento aunque sólo parcialmente de las regiones homólogas. Dependiendo de la ubicación de la inversión (pericéntrica o paracéntrica), al finalizar la asociación entre los cromosomas, pueden ocurrir pérdidas de algunos arreglos, pues en algunos casos, alguno de los cromosomas podría quedar con dos centrómeros y podrían ser desgarrados durante la segregación, mientras que otros fragmentos resultantes podrían ser acéntricos (sin centrómero), por lo que se perderían en el proceso de formación de las células germinales. Las inversiones también pueden originar deleciones y duplicaciones. Así, la presencia de inversiones deriva en que no se recuperan parcial o casi totalmente arreglos viables producto de la recombinación, debido a que la mayoría se pierde durante el proceso. En 1931, Stutervant notó que la frecuencia de intercambio entre líneas homocigas para inversiones era aproximadamente la misma que en las líneas silvestres (tabla 1) (Ashburner, 1989).

Tabla 1 Frecuencia de intercambio en la inversión homociga $ln(1) sc^8$ del cromosoma X en comparación con cromosomas silvestres (Ashburner, 1989)

INTERVALO	sc^8/sc^8	+/+
<i>w - cv</i>	6.1	6.3
<i>cv - ct</i>	4.8	8.2
<i>cv - v</i>	17.4	16.9
<i>v - f</i>	21.3	24.5
<i>f - car</i>	9.5	7.4

Cuando ocurre una inversión no hay pérdida de material genético, pero sí puede acarrear consecuencias fenotípicas cuando los rompimientos ocurren dentro de los genes o en las regiones que controlan su expresión. Aunado a esto, el orden de los genes también puede afectar la regulación de los éstos (Russell, 1998).

Aunque la presencia de inversiones no implica la pérdida de material genético, sus consecuencias son interesantes. Tal es el caso del denominado efecto de posición en el que la expresión de un gen incluido en una translocación o en una inversión, puede ser alterada si éste se sitúa en o cerca de aquellas áreas de los cromosomas que no se transcriben, como la heterocromatina o las regiones

centroméricas; o bien, por la nueva posición relativa de unos genes respecto a otros; así, si la expresión del gen está alterada como consecuencia de su reubicación, se puede producir un cambio en el fenotipo. Por ejemplo, las hembras de *Drosophila* heterocigóticas para el color de ojos *white* (*w*) presentan ojos de color rojo, pero si la región del cromosoma que tiene al alelo w^+ se trasloca cerca de una región heterocromática, se modifica su expresión a ojos moteados con manchas blancas y rojas y lo mismo ocurre si una región heterocromática se trasloca cerca del locus *w*. Otro ejemplo lo encontramos en el caso del fenotipo del ojo en forma de barra (*Bar*) en donde al comparar el número de omatidias en el ojo compuesto de moscas homocigotas para el alelo barra (*B/B*) y heterocigotas para los alelos $_B^D$ y barra (B^D/B) se encuentran 68 y 45 omatidias, respectivamente; en este caso ambos tipos de moscas portan dos regiones 16A extra y cuando estos segmentos repetidos se encuentran en el mismo homólogo el fenotipo es más pronunciado (Klug y Cummings, 2000).

Las inversiones cromosómicas interfieren con el apareamiento de los homólogos durante la meiosis, en la que es común la formación de asas, de manera que se logre el mayor apareamiento posible entre los homólogos. Una consecuencia de este tipo de apareamiento es que puede dar origen a fragmentos dicéntricos y acéntricos, que a su vez generan aberraciones adicionales. Si no ocurre entrecruzamiento, los homólogos segregarán y formarán dos gametas con cromátidas normales y dos con cromátidas invertidas; pero si llega a ocurrir el entrecruzamiento dentro de un lazo de inversión se pueden producir cromátidas anormales, cuya modificación podría interferir con la producción de descendencia viable (Klug y Cummings, 1999). La interferencia de las inversiones en el apareamiento se ha utilizado experimentalmente para mantener un grupo de alelos, que por encontrarse dentro del segmento invertido no producen arreglos recombinantes.

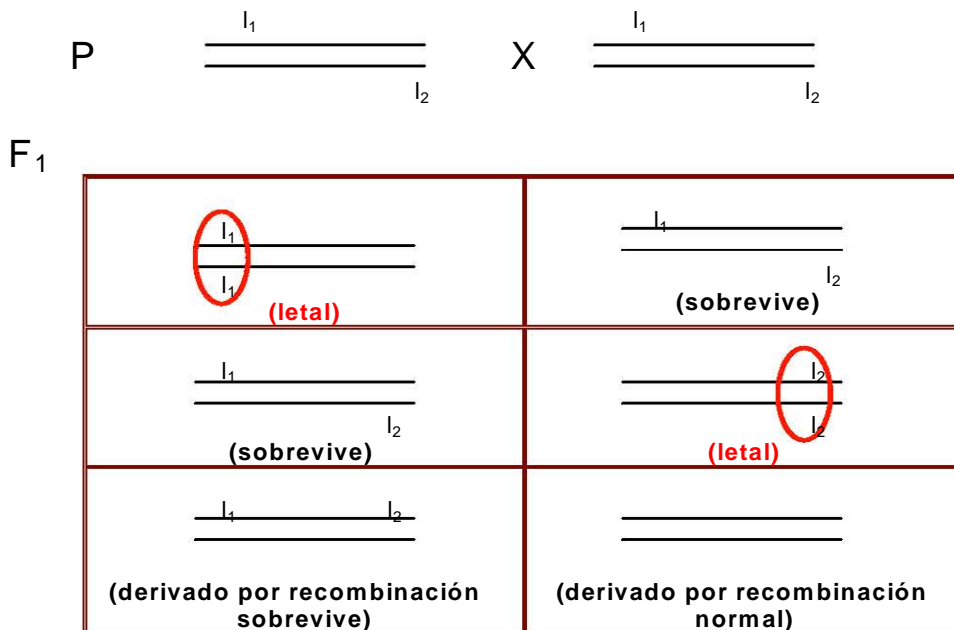
El efecto de las inversiones no siempre es negativo. Algunas inversiones han mostrado tener efectos benéficos en los organismos. Por ejemplo, si estos genes proporcionan una ventaja para la sobrevivencia de los organismos entonces la inversión es útil para la especie, como lo demostró Theodosius Dobzhansky en el mantenimiento de diferentes inversiones en el cromosoma 3 de *Drosophila pseudoscura*. Esta especie se distribuye en un amplio rango de hábitats y aunque son similares morfológicamente, las poblaciones de cada localidad varían en el orden de los genes del cromosoma 3 y son estas variaciones las que les permiten a estas moscas vivir a diferentes alturas y por lo tanto soportar

temperaturas distintas, incluso Dobzhansky encontró que la frecuencia de las inversiones cambiaba a lo largo de las estaciones del año (Klug y Cummings, 1999).

Cromosomas Balanceadores

Los cromosomas balanceadores fueron introducidos en el estudio de la genética por H. J. Müller en el año de 1918 con el propósito de mantener mutaciones letales de forma tal que no se requiriera seleccionar a los organismos con el arreglo genético deseado en cada generación. En un principio cruzó dos individuos heterocigotos para dos mutaciones letales en donde los descendientes son idénticos a los padres y de esta manera la cepa podría automantenerse (Fig. 1); sin embargo, esto no ocurrió así debido a que los cromosomas portando ambas mutaciones podían recombinar y heredarse juntas o bien, con el paso del tiempo, diluir su presencia en la población. En consecuencia, Müller introdujo un supresor de la recombinación (inversión) en uno de los cromosomas y lo marcó con una mutación dominante visible, de manera que se pudieran reconocer fácilmente los individuos heterocigotos (Ashburner, 1989).

Fig 1 Esquema de la cruce que realizó Müller para automantener una cepa portadora de dos mutaciones letales recesivas.



Actualmente, los balaceadores son cromosomas muy complejos cuya secuencia normal está alterada debido a múltiples rearrreglos inducidos por radiación en un mismo cromosoma (inversiones) o entre diferentes cromosomas (transposiciones) y son diseñados para mantener intacto a un segmento de un cromosoma o al cromosoma completo en una crucea o "stock". En general, los cromosomas balaceadores presentan tres propiedades fundamentales (Lindsley y Zimm, 1992):

- Múltiples inversiones para suprimir al máximo la recuperación de productos de la recombinación con su cromosoma homólogo.
- Mutaciones que en condición homociga son usualmente letales, producen esterilidad en un sexo o en otro ó exhiben baja viabilidad, para evitar el desplazamiento de sus homólogos en cepas balaceadas.
- Presentan marcadores (mutaciones morfológicas) que permiten su reconocimiento, usualmente en una combinación de alelos mutantes dominantes y recesivos.

El propósito de estos cromosomas es el evitar la recombinación con su cromosoma homólogo de secuencia normal y, como consecuencia, ambos tipos de cromosomas se heredan a través de las generaciones como unidades intactas (Lindsley y Zimm, 1992).

En *Drosophila*, se han diseñado diversos balaceadores para los cromosomas X, 2 y 3 pero no existen para el 4 debido a que este cromosoma es sumamente pequeño, porta pocos genes y no se ha detectado que participe en la recombinación. Los balaceadores más efectivos son aquellos que suprimen el intercambio a lo largo de todo el cromosoma; aquellos que fallan es porque tienen un segmento suficientemente largo con la secuencia normal que permite la sinapsis parcial con su homólogo, permitiendo así la recombinación de ese fragmento y ocasionando el rompimiento del balaceador, de manera que los marcadores podrían transferirse al homólogo de secuencia normal ocasionando confusiones (Greenspan, 2004).

Debido a que los machos son hemigigóticos para los genes localizados en el cromosoma X, la mayoría de los balaceadores para el cromosoma X no contiene marcadores letales recesivos; en vez de

estos, algunos portan mutaciones recesivas que provocan esterilidad en hembras para evitar que el balanceador desplace a su homólogo de secuencia normal del stock (Greenspan, 2004).

Los balanceadores son ampliamente utilizados en el mantenimiento de cepas mutantes que es de donde deriva su nombre ya que en una cruce donde los machos y las hembras portan una mutación deseada letal recesiva y el balanceador posee otra mutación letal recesiva, la única progenie que sobrevivirá serán aquellos individuos que sean heterocigotos para las dos mutaciones requeridas; es decir, aquellos que tengan a la mutación requerida en uno de los homólogos y a la otra en el cromosoma balanceador por lo que se dice que se tiene un **sistema de letales balanceados** (Greenspan, 2004).

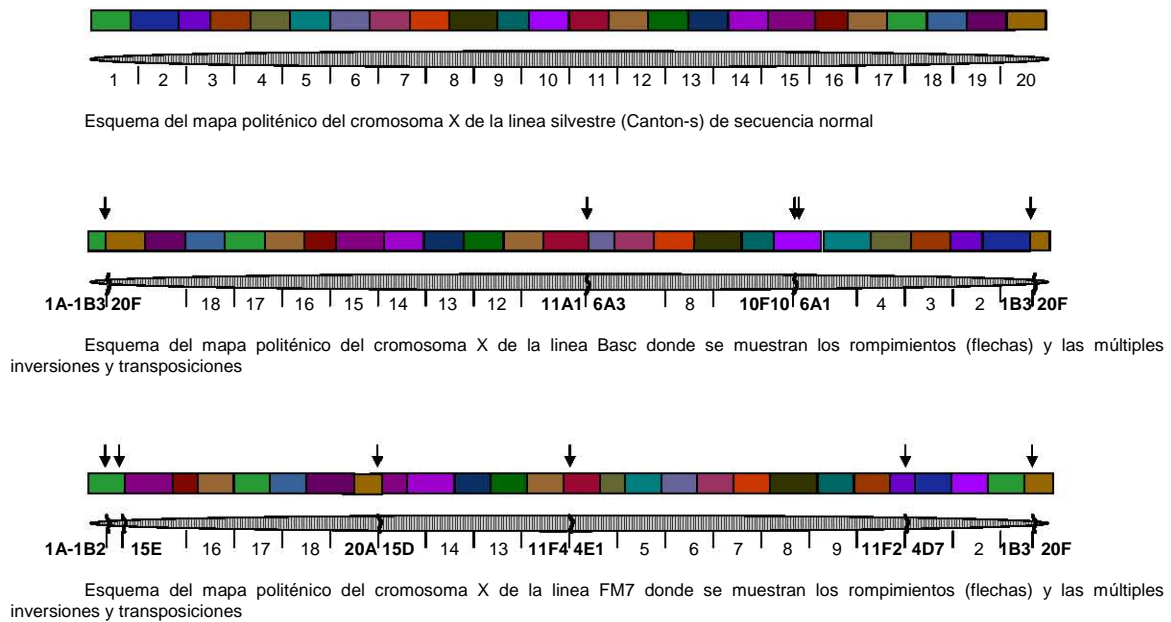


Fig. 2. Esquemas del mapa politénico del brazo X de las líneas Canton-s, Basc y FM7

Algunos cromosomas balanceadores han sido utilizados como una herramienta poderosa en el análisis de la segregación y en la predicción de genotipos, por lo que algunos de ellos han servido de base en el diseño de algunas pruebas de genotoxicidad como son: La Prueba de Reparación del ADN (FM7), la Prueba de Mutaciones Letales Recesivas Ligadas al Sexo (Basc) y la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (TM3). No obstante, a pesar de su amplio uso, existe escasa información

acerca de las consecuencias de la presencia de múltiples inversiones en aspectos como: metabolismo, el efecto de genotóxicos, especialmente los asociados a lesiones que implican la participación de la reparación postreplicativa, en la segregación de cromosomas y en la reparación por recombinación (Fig. 2).

Los balanceadores más eficientes son los siguientes (Greenspan, 2004):

- ❖ Cromosoma X
 - Basc: $ln(1)sc^{S1L}sc^{8R}+S, sc^{S1}sc^8, w^aB$
 - FM7a: $ln(1)FM7, y^{31d}sc^8B w^a v^{of}$
 - FM7b: $ln(1)FM7, y^{31d}sc^8 w^a lz^{sp}$
 - FM7c: $ln(1)FM7, y^{31d}sc^8 w^a B sn^{X2} v^{of} g^4$
- ❖ Cromosoma 2
 - SM6: $ln(2LR)SM6, la^{l2} Cy dp^{lv1} cn^2 sp^2$
 - CyO: $ln(2LR)O, Cy dp^{lv1} pr cn^2$
- ❖ Cromosoma 3
 - TM3: $ln(3LR)TM3, y^+ ri p^p sep bx^{34e}$ e. La versión más utilizada es la que porta el marcador dominante *Ser*.
 - TM6: $ln(3LR)TM6, Hrn^p ss^{p88} bx^{34e} Ubx^{p15}$ e
 - TM6B: $ln(3LR)TM6, Hu$ e. Frecuentemente con marcadores adicionales *Dichaete* (D^3) o *Tubby* (Tb).

Una práctica común para analizar la presencia de algún factor de interés, como puede ser la presencia de cromosomas balanceadores en la respuesta de genotoxicidad, es utilizar compuestos o agentes para los que se ha determinado su forma de acción, a los que se conoce de manera general como mutágenos de referencia. Es recomendable utilizar mutágenos de referencia pertenecientes a diferentes grupos químicos o tipos de acción, de manera que el análisis se realice considerando diferentes mecanismos de acción de los compuestos.

COMPUESTOS

Metil metanosulfonato (MMS)

También conocido como ácido metil metanosulfónico es un agente alquilante monofuncional de acción directa utilizado básicamente como mutágeno y clastógeno. Pertenece al grupo de los alquilalcanosulfatos, que al igual que los alquilsulfatos tienden a reaccionar como moléculas neutras por

un mecanismo de asociación S_N2 que consiste en el ataque a los anillos de nitrógeno altamente nucleofílico (Muñoz, 1995).

El MMS actúa metilando (adiciona grupos alquilo como el etilo ó el metilo) en varias posiciones sobre las bases del ADN, alterando las propiedades de apareamiento de éstas. En la guanina (metilguanina) lo hace principalmente en la posición N^7 y en las posiciones N^3 -metiladenina y O^6 -metilguanina en menor frecuencia, ocasionando que el enlace entre la base y el azúcar se debilite y se generan sitios apúricos (azúcar sin purina) que derivan en rompimientos de la hebra sencilla mediante la reparación por escisión (Vogel, 1994). En *Drosophila melanogaster* induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, pérdida parcial de cromosomas sexuales y mutación y recombinación somáticas (Graf *et al.*, 1984; Vogel, 1985; Valencia *et al.*, 1985).

Colchicina

Es un compuesto citostático por sus efectos en el ciclo celular ya que interfiere con el ensamblaje de los microtúbulos. Es el principal alcaloide de *Colchicum autumnale* (Lilaceae); posee propiedades antimitóticas, antiinflamatorias y antifibróticas. En medicina es utilizada en el tratamiento de gota y de la fiebre del mediterráneo y como antineoplásico, aunque provoca algunos efectos adversos como vómito, náusea y fatiga. Es metabolizada en el hígado, principalmente por la acción de la isoforma 3A4 del citocromo P450 a 2-dimetilcolchicina y 3-dimetilcolchicina y en ratas a 10-dimetilcolchicina (colchiceína) (Sieber *et al.*, 1978, Aardema *et al.*, 1998). En *Drosophila melanogaster* induce no disyunción y pérdida parcial de cromosomas sexuales, así como mutación y recombinación somática (Graf *et al.*, 1984; Valencia *et al.*, 1985; Muñoz, 1997).

Azida de Sodio

Es un agente altamente tóxico, inhibidor de la citocromo oxidasa que interfiere con la respiración celular. Puede causar hipotensión, taquicardia, taquipnea, hipotermia, convulsiones y severo dolor de cabeza.

Se usa en medicina como vasodilatador para controlar la presión sanguínea, en síntesis orgánica del ácido hidrazoico y de sodio puro, como conservador de reactivos de laboratorio, nematocida y herbicida y en las bolsas de seguridad de los automóviles.

La actividad mutagénica de la azida de sodio se debe a la producción de un metabolito orgánico que es un análogo del aminoácido llamado L-azidoalanina producido por la actividad de la enzima O-acetilserina sulfidrilasa. En células somáticas de *Drosophila melanogaster*, induce recombinación mitótica dependiente de homología (González y Ramos, 1997).

Cianato de Sodio (NaOCN)

El cianato de sodio ha mostrado tener un efecto inhibitorio en ciertas variedades de tumores sólidos en roedores. Se requiere del metabolismo del cianato de sodio *in vitro* para que se pueda ver su efecto sobre células cancerosas, en las que inhibe la síntesis de proteínas (Lea *et al.*, 1975). El cianato de sodio no tiene un efecto inhibitorio del desarrollo del cáncer, pero sí de la proliferación de tumores (Allfrey *et al.*, 1977). En *Drosophila*, el cianato de sodio administrado subcrónicamente por alimentación a larvas de tercer estadio no induce mutación somática de manera significativa (Jiménez, 1998, Ramírez, 2003).

Talidomida

La Talidomida (N-phthalimidoglutarimide) fue sintetizada en 1954 y administrada como sedante y tranquilizador. Químicamente es un compuesto similar a los barbitúricos por lo que no fue autorizada por la agencia de Alimentos y Administración de Drogas (FDA) de los Estados Unidos y fue retirada de los mercados en 1962 debido a sus efectos teratogénicos producidos en los niños cuyas madres ingirieron el medicamento durante las primeras semanas de gestación; sin embargo, por sus propiedades, en 1965 resurgió para el tratamiento de la lepra y actualmente se usa para tratar otras enfermedades como cáncer, enfermedades de la piel, afecciones del sistema inmune, como el lupus y para el VIH, entre otras (Ando *et al* 2002. Hansen *et al* 2002, Reist *et al* 1999, Zhuet *al* 1998).

Se considera que la actividad biológica de la talidomida se debe a la parte glutarimídica de la molécula. La actividad teratogénica de la molécula depende de su bioactivación a más de 20 productos

por el citocromo P450 (CYP2C19), prostaglandina H-sintetasa y lipooxigenasas, que además producen compuestos electrofílicos y radicales libres que pueden oxidar DNA, proteínas y lípidos (Parman *et al.*, 1999). Los resultados con respecto a la actividad mutagénica de la talidomida en diversos modelos biológicos son contradictorios. En *Drosophila melanogaster*, la administración de bajas concentraciones de talidomida a larvas de tercer estadio induce mutación y recombinación somáticas (Ramos *et al.*, 2005).

Mitomicina C (MMC)

La MMC es un antibiótico potente que alquila al ADN, inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas e interfiere con la división celular. Actúa como un agente alquilante bi y trifuncional, principalmente durante las fases del ciclo celular G1 y S temprana. Induce mutación génica, delección, no disyunción y recombinación somática en *Drosophila*; produce entrecruzamientos que se reparan por escisión y por recombinación (Ramírez, 2003).

OBJETIVO

Evaluar el efecto de las inversiones múltiples de los cromosomas balanceadores en la sobrevivencia de *Drosophila melanogaster* en presencia de seis compuestos genotóxicos con diferente mecanismo de acción.

HIPÓTESIS

El cambio en la localización de los genes y la pérdida de homología asociada a la presencia de múltiples inversiones afectará la expresión génica y mecanismos dependientes de homología como la recombinación en moscas expuestas a diferentes compuestos genotóxicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos

Se utilizaron seis compuestos, cada uno con diferente actividad. De cada compuesto se probaron tres concentraciones, obtenidas mediante diluciones sucesivas a partir de la anterior. Las concentraciones se seleccionaron con base en su actividad mostrada en *Drosophila* utilizando otras pruebas para evaluar actividad genotóxica. Se trabajó un compuesto por día con su repetición al día siguiente y cada dilución se probó por triplicado.

Los compuestos y las concentraciones que se utilizaron son los siguientes:

Azida de Sodio	Merck	[CAS 26628-22-28]	0.38, 0.19 y 0.095 mM
Colchicina	Nutricional Bioch. Corp	[CAS 64-86-8]	0.006, 0.003 y 0.0015 mM
Metilmetano Sulfonato	Aldrich Chemical Company Inc.	[CAS 66-27-3]	0.01, 0.005 y 0.0025 mM
Cianato de Sodio	Janssen Chimica	[CAS 917-61-3]	10, 5 y 2.5 mM
Mitomicina C	Sigma	[CAS 50-07-7]	0.0025, 0.00125 y 0.000625 mM
Talidomida	ICN Biomedicals Inc.	[CAS 50-35-1]	0.0024, 0.0006 y 0.00015 mM

Lineas

Se ocuparon tres líneas de moscas; dos de las cuales presentan balanceador en el cromosoma 1 (X) que son: la línea FM7/mei9^amei41^{D5} y la Basc/Basc y una tercer línea de tipo silvestre: Canton-S. Las moscas de tipo silvestre se utilizaron como testigo de línea para las funciones involucradas como son metabolismo, reparación y recombinación.

FM7c (First Chromosome Multiple 7) (Fig. 3)

Constitución: $ln(1)FM7, y^{31d} sc^8 w^a B sn^{X2} v^{Of} g^4$

Orden: 1A - 1B|20F - 20E|15E - 20A|15D - 11F4|4E1 -11F2|4D7 - 1B3|20F

Propiedades: Esta cepa presenta al cromosoma balanceador FM7 que se utiliza para mantener estables a dos mutaciones recesivas que son: *mei9^a* y *mei41^{D5}*, las cuales confieren sensibilidad a mutágenos, ya que su presencia altera a la reparación por escisión y la postreplicativa, respectivamente,

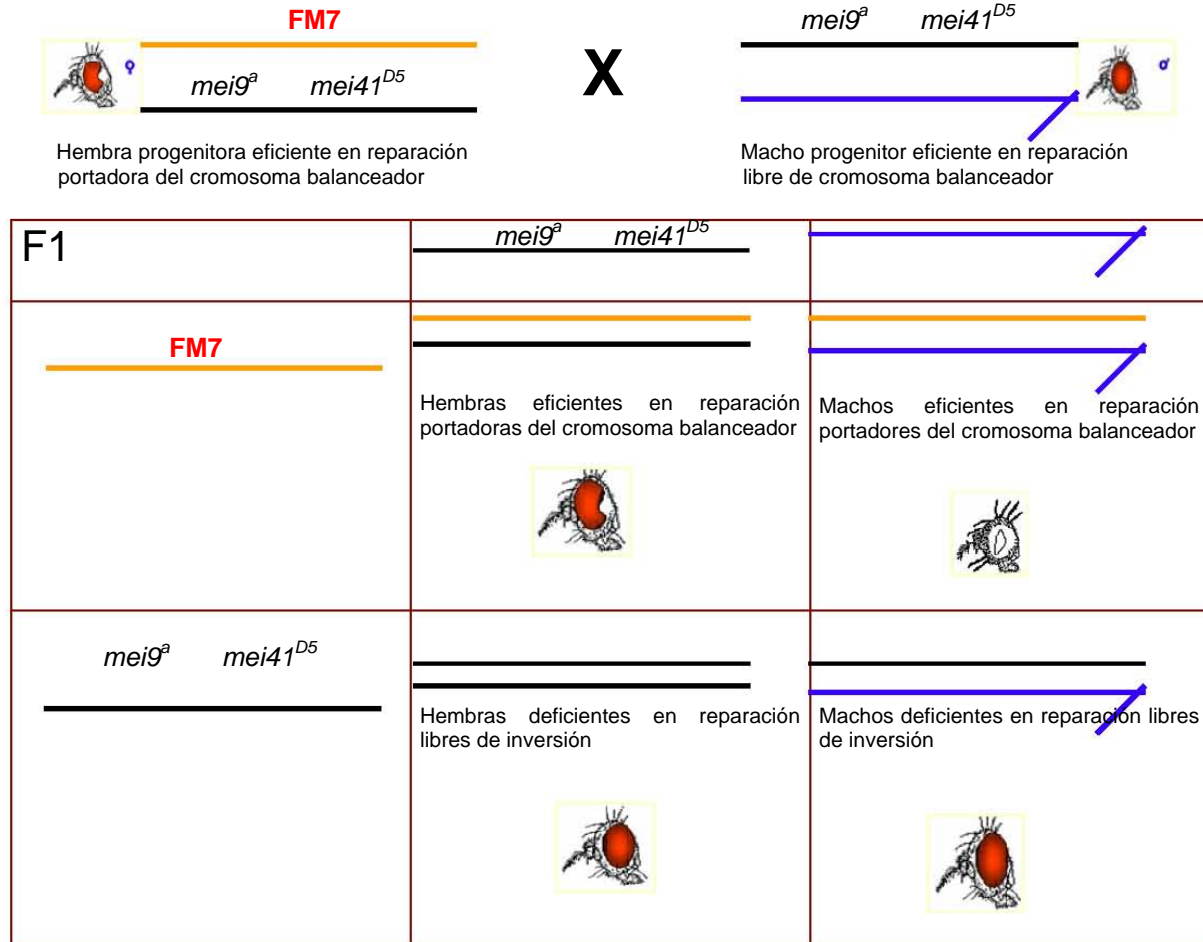
además, en ambos casos reducen la recombinación meiótica, inducen la recombinación mitótica y aumenta la frecuencia de no disyunción. La mutación *mei41^{D5}* provoca esterilidad en hembras homocigóticas (Lindsley y Grell, 1972).

La progenie que se obtiene de esta cruce produce cuatro fenotipos en una proporción teórica de 1:1:1:1, en donde dos de ellos (un macho y una hembra) son portadores del cromosoma balanceador y por lo tanto son considerados eficientes en los mecanismos de reparación, mientras que los otros dos (macho y hembra) son portadores de las mutaciones recesivas que confieren la sensibilidad a los mutágenos (Fig. 3). Con este sistema de cruce se puede detectar daño directo al ADN al establecer la relación entre el número de machos y de hembras deficientes y eficientes en reparación, y el efecto de los compuestos se manifiesta en la pérdida gradual de organismos considerando que un compuesto tiene actividad para inducir lesiones que se reparen por escisión o por recombinación cuando la proporción de moscas sobrevivientes deficientes en reparación sea menor a la proporción de las moscas eficientes y negativo cuando no existan estas diferencias de sobrevivencia en ambos tipos de moscas (Rivas, 1999).

Este cromosoma balanceador es un excelente supresor de la recombinación del cromosoma X. Los marcadores que porta son (Lindsley y Zimm, 1992):

- *y^{31d}*: yellow (1-0.0), cuerpo amarillo
- *sc⁸*: arreglo scute *ln(1)B2-3;20B-D1*
- *w^a*: white apricot (1-1.15), ojos color durazno
- *B*: barra (1-57.0), ojos en forma de barra en condición homociga
- *sn^{X2}*: singed from X irradiation (1-21.0), tricomas cortos y ondulados
- *v^{Of}*: vermilion de Offerman (1-33.0), ojos color rojo brillante
- *g⁴*: garnet (1-44.4), el pigmento de los ojos es reducido y en combinación con *w^a* y *v^{Of}* se obtiene por resultado la ausencia total de pigmentos y se recobran moscas con ojos de color blanco.

Fig. 3 Esquema de la cruce de la línea FM7 con los cuatro fenotipos recobrados en la progenie



Basc (Fig. 4)

Constitución: $ln(1)sc^{S1L} sc^{BR} + S, sc^8 sc^{S1} w^a B$

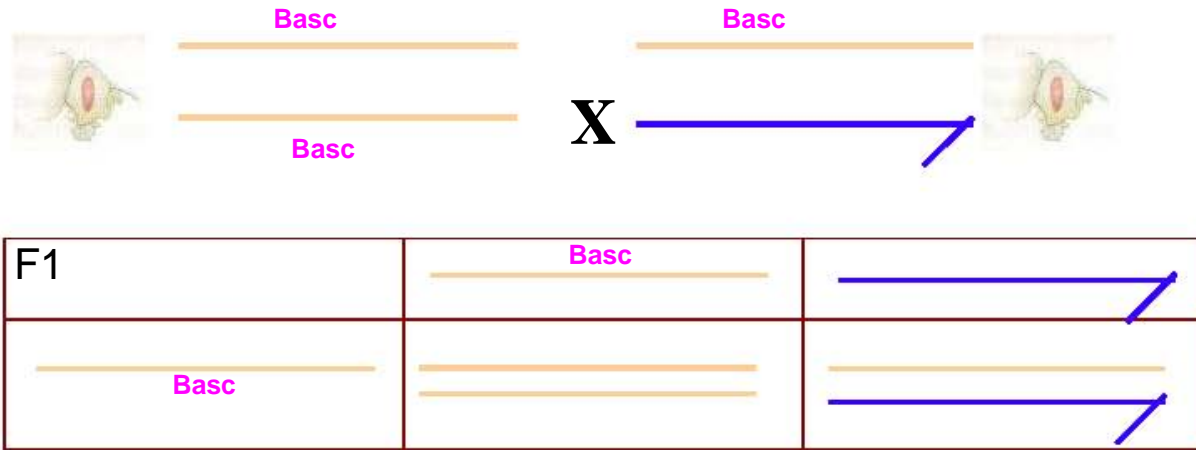
Orden: 1A - 1B3|20F - 11A1|6A3 - 10F10|6A1 - 1B3|20F.

Propiedades: Los machos de esta cepa son hemocigotos, mientras que las hembras son homocigotas, ambos viables y fértiles; toda la progenie que se obtiene es igual a los padres (Fig. 4).

Al igual que el cromosoma balanceador FM7, Basc también es un buen supresor de la recombinación en el cromosoma X. Los marcadores que presenta para su reconocimiento son (Lindsley y Zimm, 1992):

- w^p : white apricot (1-1.15), ojos color durazno
- B : barra (1-57.0), ojos en forma de barra en condición homociga

Fig. 4 Esquema de la cruce de la línea Basc y su progenie recobrada



Canton-s (Fig. 2)

Las moscas Canton-S (C-S) son línea de moscas de tipo silvestre que es considerada como línea testigo, pues no presenta algún tipo de alteración en sus cromosomas, se utiliza como referencia para evaluar el efecto que tienen las múltiples inversiones mediante la comparación del índice de sobrevivencia de cada una de las líneas y la de tipo silvestre.

Sincronización

A frascos con medio de cultivo fresco se agregó levadura con azúcar y se colocaron por separado, moscas adultas de cada una de las líneas (C-S, Basc y FM7) por un período de ocho horas para obtener huevecillos. Una vez transcurrido el tiempo se retiraron a todos los adultos de los frascos y éstos se incubaron durante tres días bajo condiciones controladas de laboratorio (25° C y 60% de humedad) para obtener larvas de 72±4 h de edad.

Tratamiento

Transcurrido el tiempo de incubación se obtienen las larvas de cada uno de los frascos haciéndolas flotar mediante una solución de sacarosa al 20%, se pasan por un embudo de separación y se capturan en una malla de tela de donde se toman grupos de 100 a 150 larvas y se colocan en tubos homeopáticos previamente preparados con 0.7 g de medio instantáneo para moscas (Carolina) y 3.5 ml de solución de cada compuesto. Se deja que continúen su desarrollo y se recupera a los adultos. Se cuantifica el número total de organismos que emergieron, así como el número de hembras y de machos que forman parte de dicho tratamiento y con base en esos resultados se obtiene el índice de sobrevivencia para cada uno de los tratamientos y línea de moscas, así como la proporción de fenotipos: hembras y machos portadores del cromosoma balanceador (eficientes en reparación) así como hembras y machos libres de inversión (deficientes en reparación)

RESULTADOS

Para comparar el efecto de los compuestos probados se utilizó el índice de sobrevivencia (IS), que muestra a la fracción de organismos que sobreviven a un tratamiento, con respecto al total de organismos expuestos y la proporción fenotípica de cada una de las líneas en donde podemos observar el aporte que hace cada uno de los fenotipos al total de la progenie recobrada. La tabla II muestra los promedios de los IS determinados en las seis repeticiones experimentales para cada compuesto. Los resultados de los análisis estadísticos se presentan en el Anexo 1.

El tratamiento con colchicina redujo la sobrevivencia de las moscas de tipo silvestre C-S en un 13 % a partir de la menor concentración [0.0015 mM] y alcanzando el 17 % de mortalidad en la concentración más alta probada [0.006]. Esta concentración fue la única en la que se observó menor sobrevivencia en las moscas Basc (69 %). El efecto del tratamiento en las moscas FM7 fue más enérgico ya que a partir de la segunda concentración, sólo se recobró al 62 y 60 % de las moscas expuestas, respectivamente. (Fig. 5)

Al comparar el efecto de los factores concentración y línea de moscas, se encontró que únicamente el efecto de la concentración fue significativo ($p < 0.003$); las diferencias se confirmaron mediante la prueba de Tukey, en la que se establecieron dos grupos, el formado por la sobrevivencia de las moscas de los lotes testigo y 0.0015 mM y el de las moscas expuestas a 0.006 mM ($p < 0.0015$ y $p < 0.02$, respectivamente).

Al analizar el efecto por fenotipo y sexo se observó que moscas de las líneas silvestre y Basc presentan una mayor proporción que los cuatro fenotipos de la progenie de la línea FM7 ($p < 0.001$) (Fig. 6); en esta misma línea también hay diferencias significativas entre los fenotipos recobrados de esta cepa, excepto entre las hembras deficientes y las eficientes en reparación. La relación encontrada puede representarse de la siguiente manera: [hembras, machos C-S = hembras, machos Basc] > [(hembras eficientes = hembras deficientes) > (machos deficientes > machos eficientes)] [$\text{♀}^{\text{C-S}} = \text{♀}^{\text{Basc}}$] > [($\text{♀}^{\text{e}} = \text{♀}^{\text{d}}$) > ($\text{♂}^{\text{d}} > \text{♂}^{\text{e}}$)].

El índice de sobrevivencia de las líneas C-S y Basc, para el tratamiento con MMC, es muy similar, manteniéndose ambos alrededor de su grupo testigo (Tabla II, Fig 7). La línea FM7 mostró una pérdida

gradual de organismos, hasta de un 43% en la concentración más alta; siendo esta diferencia significativa para la línea y para la concentración más alta, comparada con su testigo; también se encontraron diferencias significativas entre la interacción fenotipo-concentración entre la cepa FM7 en la concentración mas alta y el resto de las moscas y concentraciones; excepto con la línea Basc en las concentraciones 3 [0.00125] y 4 [0.0025], en las que no hay diferencias. La relación encontrada puede resumirse de la siguiente manera: C-S = Basc > FM7. En la figura 8, en la que se muestra el efecto por fenotipos pueden observarse dos grupos, el primero formado por las moscas de las cepas silvestre y Basc y un segundo grupo, correspondiente a las moscas de la línea FM7 (hembras y machos eficientes y deficientes en los mecanismos de reparación) ($p < 0.05$); entre las moscas de la línea FM7, también se encontraron diferencias entre hembras y machos, siendo los machos eficientes diferentes de todos los demás fenotipos. Asimismo se encontró una respuesta similar para la interacción: concentración-fenotipo. En síntesis, la relación encontrada puede representarse de la siguiente manera: [$\text{♀♂C-s} = \text{♀♂Basc}$] > [$\text{♀e} = \text{♀d}$] > [$\text{♂d} > \text{♂e}$].

En las diferentes concentraciones con MMS el IS de las moscas de las líneas silvestre y Basc es similar al del testigo respectivo; en las moscas de la línea FM7 se recobró un IS ligeramente mayor en las concentraciones 0.0025 y 0.01 mM, pero no alcanzó a ser significativo (Tabla II y Fig. 9). La relación encontrada puede representarse de la siguiente manera: C-S = Basc = FM7. Al analizar el efecto por fenotipos y sexo, se identificaron dos grupos ($p < 0.05$); en el primero están las hembras y machos de la cepa silvestre y la Basc y por el otro están las moscas FM7 que muestran diferencias entre sus fenotipos pero no así entre las hembras y machos que no portan el balanceador (Fig. 10). Para la interacción de las variables podemos observar que prácticamente toda la cepa FM7 es distinta de las otras dos líneas y dentro de ella, son los machos portadores del balanceador los que presentan más diferencias con las hembras en general y con los machos deficientes en las dos últimas concentraciones. La relación encontrada puede representarse de la siguiente manera:

[$\text{♂Basc} > \text{♀♂C-S} > \text{♀Basc}$] > [$\text{♀e} > \text{♀♂d} > \text{♂e}$].

El tratamiento con Azida de Sodio, redujo el IS de las tres líneas de moscas. En las moscas silvestres se recuperó el 68 y 33 % de las moscas tratadas con 0.19 y 0.38 mM; en la Basc se recuperó el 68 % en la concentración menor probada y en las concentraciones superiores se recobró al 39 y 29 % de

las moscas tratadas con 0.19 y 0.38 mM, respectivamente; finalmente, el tratamiento resultó letal para el 12, 74 y 79 % de la progenie FM7 expuesta (Tabla II y Fig. 11). El efecto de la concentración resultó significativo independientemente de la línea de moscas ($p < 0.001$), siendo diferentes la concentración menor [0.095 mM] y el testigo de las dos concentraciones superiores 0.19 y 0.38 mM ($p < 0.01$). El análisis por concentración y fenotipos reveló la existencia de efectos significativos para los dos factores, siendo el efecto de la mayor concentración probada [0.38 mM] diferente del provocado por el resto de las concentraciones ($p < 0.001$); con respecto a los fenotipos, prácticamente los cuatro tipos de la progenie FM7 fueron diferentes significativamente del resto ($p < 0.004$) (Fig. 12). Se distinguen los machos silvestres, C-S que muestran un IS igual en el testigo y en todas las concentraciones; las hembras y machos Basc, las hembras silvestres y las hembras de la línea FM7 que mostraron IS similares, entre sí; un siguiente grupo lo integran los machos de la línea FM7, tanto eficientes como deficientes en reparación. En este caso sólo la concentración más alta produjo diferencias significativas. La relación encontrada puede representarse de la siguiente manera:

$$[(\text{♂CS})] > [(\text{♀♂Basc} = \text{♀C-S} = \text{♀e} = \text{♀d})] > [\text{♂d} = \text{♂e}].$$

En el caso de las moscas tratadas con Cianato de Sodio (Tabla II y Fig. 13), el tratamiento no modificó el IS de las moscas silvestre y Basc. En las moscas de la progenie FM7 el IS fue 38 y 31% mayor que el de las moscas testigo en las moscas tratadas con 2.5 y 5 mM, respectivamente; sin embargo, el tratamiento con 10 mM de NaCNO redujo el IS en un 32%. El análisis por concentración-línea de moscas detectó efecto tanto de la variable concentración, como de la interacción concentración-línea de moscas ($p < 0.03$), no obstante, la comparación posterior de los promedios mediante la prueba de Tukey, no confirmó la fuente de variación. El análisis del efecto del tratamiento de acuerdo con el fenotipo de las moscas mostró diferencias entre las moscas silvestre y Basc con las de la progenie FM7 ($p < 0.001$), además estableció diferencias entre cada uno de los fenotipos derivados de esta cruce (Fig. 14). Se observó un grupo compacto compuesto por hembras y machos de las líneas Basc y C-S y por debajo se encuentran los cuatro fenotipos que forman la cepa FM7 en el siguiente orden: hembras deficientes, hembras eficientes, machos deficientes y en menor proporción los machos eficientes en reparación. En resumen, la relación encontrada puede representarse de la siguiente manera: $[\text{♀♂C-S} = \text{♀♂Basc}] > [\text{♀d} > \text{♀e} > \text{♂d} > \text{♂e}]$.

En las moscas tratadas con cualquiera de las concentraciones de talidomida se observó un IS similar entre ellas y prácticamente igual al de sus correspondientes testigos: (C-S = Basc = FM7) (Tabla II, Fig. 15). En cuanto a las proporciones fenotípicas, se observó el mismo comportamiento de los compuestos anteriores pero en este caso el grupo formado por las líneas silvestre y Basc es muy compacto y diferente a los cuatro fenotipos de la línea FM7 que también mostraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0.001$), siendo las hembras eficientes las que aparecen en mayor número, seguidas por las hembras deficientes, en tercer término aparecen los machos deficientes y en menor proporción están aquellos que son eficientes en reparación (Fig. 16). La relación encontrada puede representarse de la siguiente manera: $[\text{♀♂C-S} = \text{♀♂Basc}] > [\text{♀e} > \text{♀d} > \text{♂d} > \text{♂e}]$.

DISCUSIÓN

El ADN es el material genético de la gran mayoría de los seres vivos y su estructura proporciona las bases químicas para almacenar y expresar la información genética en las células, así como para transmitirla a las generaciones futuras, para que esto se pueda llevar a cabo de manera adecuada es necesario que la molécula contenga en forma estable toda la información necesaria, que sea capaz de replicarse y de pasar esa información a las células hijas (Russell, 1998).

Sin embargo el material genético también es una molécula que puede sufrir cambios o mutaciones que pueden tener consecuencias significativas para los organismos en el sentido de que su expresión puede verse alterada en diferentes grados e incluso ser letal para su portador ó a nivel de los cromosomas (aberraciones cromosómicas) en donde se puede alterar la estructura normal del cromosoma o su número dentro de la célula (Russell, 1998).

En el presente trabajo se analizó el índice de sobrevivencia y la proporción de fenotipos de tres líneas de moscas distintas tratadas durante el estadio larvario con compuestos con actividad conocida: la línea *Basc*, que presenta la inversión denominada *Basc* en condición homocigótica para las hembras y hemicigótica para los machos. Comparada con las moscas de tipo silvestre el cambio de orden en los genes del cromosoma X de las moscas *Basc* resulta indicativo de si la posición de los genes altera un efecto genotóxico; la línea FM7 que porta dos genes recesivos, *mei9^a* y *mei41*, que generan deficiencia en la capacidad de reparar el daño genético mediante escisión y recombinación homóloga, respectivamente, por lo que se hace necesario la presencia del cromosoma balanceador del cromosoma X, *FM7*, de manera que la línea se mantenga estable. Los cuatro fenotipos derivados de la línea *FM7* presentan tanto cambio en la secuencia de genes (hembras y machos denominados eficientes en reparación) como la acción de mutaciones que interfieren con la reparación del daño al ADN (hembras y machos considerados deficientes en reparación). Así, la comparación del IS de las moscas *FM7* con el de las moscas *Basc* y las de tipo silvestre permite identificar si el orden de los genes, así como la falta de homología interfieren en el efecto genotóxico; como testigo de línea se utilizaron moscas de tipo silvestre de la cepa Canton-S.

El IS, como una medida del efecto global de la exposición a genotóxicos es una herramienta útil, especialmente cuando se utiliza tomando como referencia el efecto en organismos que no contienen en su genotipo ni mutaciones morfológicas o asociadas con alguna deficiencia, ni arreglos en los cromosomas que pudieran modificar la posibilidad de sobrevivencia de los organismos. Un elemento cotidiano en el análisis de la mutagénesis es el uso de marcadores o mutaciones que tienen una expresión morfológica, de manera que el seguimiento de éstos sea indicativo de los posibles eventos genéticos que ocurren, especialmente cuando se busca entender el efecto en organismos intactos, sin embargo, es posible que la presencia de estos marcadores morfológicos pueda a su vez intervenir en la expresión de otros atributos no necesariamente considerados, como puede ser la modulación de la actividad metabólica del organismo que porta la mutación.

Por otro lado, la presencia de arreglos complejos, como las inversiones múltiples, que constituyen la base de los llamados cromosomas balanceadores, puede convertirse en una variable adicional (no necesariamente contemplada) que interfiera con la actividad genotóxica en estudio. El cambio de posición de los genes a lo largo de los cromosomas modifica necesariamente la relación que existe entre un gen y las secuencias que participan en la regulación de su expresión, así como las relaciones entre este gen y otros genes. Uno de los primeros genes para los que se estableció la importancia de su posición es el gen *Bar (B)* de *Drosophila*, la presencia de *Bar* reduce el número de las omatidias que forman al ojo compuesto de la mosca y su efecto cambia dependiendo del número de copias de la secuencia del gen, así como de si estas copias se encuentran sobre el mismo cromosoma (posición cis) o una copia en cada uno de los homólogos (posición trans) (Russell, 1998).

El uso de inversiones en el estudio de la mutagénesis ha sido recurrente y, en el caso particular de *Drosophila*, constituye la base para el diseño de diversos sistemas de cruces. No obstante lo anterior, poco se sabe de la influencia que puede tener la presencia de inversiones en el efecto de genotóxicos en este organismo.

De los compuestos probados, sólo en el caso de la talidomida, un compuesto para el que se ha propuesto la hidrólisis espontánea de la molécula para generar los derivados reactivos (Ramos et al., 2005), el IS de las moscas de la línea FM7 fue similar al de las otras líneas; con los tratamientos con MMC (promutágeno inductor de enlaces cruzados) (Vogel, 1994) y colchicina (aneuploidógeno) (Sieber et

al., 1978; Muñoz, 1995) el IS de las moscas de la línea *FM7* resultó significativamente menor al de las otras líneas. En el tratamiento con NaN_3 (promutágeno con actividad recombinogénica dependiente de homología) (González y Ramos, 1997), el IS de las moscas silvestres fue diferente al de las moscas con inversiones (*Basc* y *FM7*) y finalmente, en los tratamientos con MMS (mutágeno directo e importante inductor de estrés) (Vogel, 1994) y NaCNO (anticarcinógeno con actividad sólo en células cancerosas, probablemente asociado a la actividad metabólica de estas células), el IS de las moscas *FM7* fue mayor en algunas concentraciones que el de las otras líneas (Allfrey et al., 1977).

En el caso de las moscas expuestas a los tratamientos con talidomida, cianato de sodio y metilmetano sulfonato, tanto la línea silvestre como la *Basc* tienen un IS similar en todas las concentraciones y siempre similar a su grupo testigo, mientras que la línea *FM7* se recobra con un índice de sobrevivencia mayor a las anteriores pero no significativo. Para los tratamientos con mitomicina C y colchicina encontramos de nueva cuenta a la línea silvestre y a la *Basc*, con un IS similar y cercano a su lote testigo y a la línea *FM7*, por debajo de ellas. Finalmente, la azida de sodio resultó ser un compuesto más tóxico para las moscas y todas las líneas tratadas siguen una curva similar en las tres concentraciones. El hecho de que la cepa *Basc*, que es portadora de cromosomas balanceadores se comporte de manera similar a la cepa testigo, puede explicarse porque el cromosoma invertido no lleva mutaciones detrimentales letales, por lo que en las hembras puede estar en condición homocigótica y los machos son viables, siendo posible el reconocimiento de secuencias que podría ser importante en la reparación de lesiones mediante recombinación entre homólogos y por lo tanto el posible daño que pudieran haber sufrido por acción de los compuestos podría ser reparado por recombinación de igual manera a como lo haría la línea silvestre. Por el otro lado, la línea *FM7* se comporta de manera diferente, algunas veces recuperándose en mayor número y otras, con menor frecuencia y es que aquí están presentes dos factores que afectan la sobrevivencia de esta línea: el primero de ellos es la presencia del cromosoma balanceador que se encuentra en condición heterocigota lo que impide que el daño ocasionado pueda ser reparado por recombinación en aquella progenie que lo porte y como se verá más adelante, afecta de diferente manera a machos y a hembras y el segundo factor es la presencia de las dos mutaciones de los genes meióticos *mei9^a* y *mei41^{D5}*, que interfieren con los mecanismos de reparación por escisión y postreplicativa en donde también se ven más afectados los machos.

Aparte del índice de sobrevivencia se calculó el índice de sobrevivencia corregido por fenotipos (ISF) con el que se comparó el número de individuos obtenidos por cada fenotipo, tomando como referencia la proporción del fenotipo en el lote testigo.

Para cada uno de los compuestos probados se pueden distinguir dos grupos significativamente diferentes: Un grupo está formado por hembras y machos de las líneas *Canton-S* y *Basc* que es el grupo más numeroso, y el otro lo forman la progenie de la línea *FM7* en donde cada uno de los fenotipos se recobra en diferente proporción en todas las concentraciones incluyendo al grupo testigo lo cual habla de que la propia constitución de esta cepa afecta a la sobrevivencia de cada uno de los fenotipos y modifica la proporción 1:1:1:1 esperada.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la sobrevivencia de cada uno de los fenotipos obtenidos en la cruce *FM7* es significativamente diferente de lo esperado:

- de manera general, no se espera que alguno de los cuatro fenotipos se presente en menor proporción que otro, sin embargo, consistentemente se recobró una menor proporción de los machos portadores del cromosoma balanceador (*FM7/Y*).
- tanto las hembras como los machos portadores del cromosoma balanceador se consideran eficientes en la reparación de lesiones al ADN, sin embargo, en el caso de las hembras, la presencia del cromosoma *FM7* interferiría con la reparación postreplicativa debido a la presencia de las numerosas inversiones que forman a este cromosoma (ausencia de homología); por otro lado, en los machos, esta situación no se presenta, sin embargo, es probable que el cambio en la posición de los genes en el cromosoma X interfiera con la regulación de la expresión de éstos. De esta manera, los machos *FM7*, supuestamente eficientes en reparación, resultan los organismos más susceptibles de la cruce.

Así, en las moscas de la progenie de la cruce *FM7*, la tendencia en la sobrevivencia observada para cada uno de estos fenotipos fue: la mayor sobrevivencia la encontramos en las hembras que portan al cromosoma balanceador y por lo tanto son eficientes en los mecanismos de reparación, debido a que

no expresan la deficiencia en la reparación del ADN; le siguen las hembras libres de inversión que son deficientes en dichos mecanismos, posteriormente se ubican los machos que tampoco portan al cromosoma invertido, mismos que deberían mostrar todo el efecto de la exposición a genotóxicos ya que no podría reparar lesiones por ninguna de las vías involucradas (escisión y postreplicativa) y con la menor frecuencia de todos están los machos FM7, que portan al cromosoma balanceador y que no tienen las mutaciones en los genes *mei*.

De acuerdo a esta posición de los fenotipos de esta línea podemos ver un efecto contrario en aquellas moscas que portan al cromosoma balanceador, esto es que afecta de diferente manera a hembras que se recobran en un número mayor que a machos siendo estos los más afectados.

Las mutaciones *mei* (*mei9^a* y *mei41^{D5}*) utilizadas en esta línea se mantienen balanceadas mediante el uso de *FM7* para evitar que se alcance la homocigosis, ya que provocan la esterilidad en hembras (*mei41^{D5}*). Al ser mutaciones recesivas, sólo en homocigosis se espera observar un efecto detrimental de la presencia de éstas y, por otra parte, se considera que teóricamente, la mosca es capaz de reparar lesiones en el ADN, debido a que genéticamente es heterocigota para las mutaciones (*mei9^a* y *mei41^{D5}*) que no muestran una expresión morfológica, sino funcional

Caso contrario ocurre en las líneas Basc y Canton-S en donde a pesar de estar ambas líneas cercanas, para todos los tratamientos son los machos los que aparecen en mayor proporción que las hembras. En este caso pueden estar influyendo varios factores: uno es que el efecto que va a tener un cromosoma balanceador sobre un organismo también depende del tipo y número de inversiones que pueda tener, los sitios en donde se originan los rompimientos ya que pueden caer dentro del gen o dentro de su región promotora con lo cual se puede ver afectada la expresión de dicho gen, así como el nuevo orden de genes que se genera dentro del cromosoma lo que puede resultar ventajoso o no para un individuo.

En resumen, los resultados obtenidos permiten establecer que 1) el cambio en el orden de los genes sí interfiere con la genotoxicidad, especialmente si el metabolismo del organismo relacionado con la activación, desactivación del mutágeno depende o se asocia con genes localizados en el cromosoma X; 2) la presencia de cromosomas invertidos también modifica la genotoxicidad de un compuesto, siendo el efecto más evidente cuando el cromosoma se encuentra en heterocigosis y 3) la interacción del cambio

en el orden de los genes, así como la presencia de genes detrimentales modifica de manera importante un efecto genotóxico.

Lo anterior es particularmente importante en el diseño e interpretación de cruzas y metodologías experimentales en las que se utilizan arreglos especiales para estabilizar a algunos genes. De esta manera, el diseño de sistemas de cruzas podría interpretarse de manera equivocada y conducir a conclusiones falsas. Por ejemplo, un compuesto como la azida de sodio, que induce lesiones que pueden ser reparadas por recombinación dependiente de homología, cuando es probada utilizando la prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila*, se observa que incrementa significativamente la frecuencia de manchas mutantes en las alas de las moscas que tienen un arreglo heterocigoto, libre de inversiones ($mwh +/+ flr^3$), pero es negativo en las moscas portadoras de inversión ($mwh +/TM3, Ser$) derivadas de la misma cruce (González y Ramos, 1997). Por su mecanismo de acción como atrapador de oxígeno excitado, la azida de sodio produce lesiones también en las moscas portadoras del cromosoma balanceador, sin embargo, debido al arreglo cromosómico no es posible recobrar manchas mutantes en las alas de estas moscas, lo que no debe interpretarse como actividad negativa del compuesto. Es probable que las lesiones inducidas en las células de las alas de las moscas portadoras, al no poder ser reparadas deriven en la eliminación de las células afectadas (efecto citotóxico), con lo cual no sólo no se incrementaría la frecuencia de manchas, sino que inclusive, se recobrarían menos manchas que en las moscas no expuestas, lo cual se ha comprobado. En estos casos, es recomendable utilizar otros indicadores de genotoxicidad como puede ser el análisis de índice de sobrevivencia de los organismos expuestos a la acción de genotóxicos o bien, la comparación en el tipo y tamaño de las manchas inducidas, ya que estos aspectos también son sensibles a la presencia de agentes genotóxicos.

CONCLUSIONES

1. El cambio en el orden de los genes interfiere con la genotoxicidad, especialmente si el metabolismo del organismo relacionado con la activación/desactivación del mutágeno depende o se asocia con alguno(s) de los genes que han cambiado de localización

2) La presencia de cromosomas invertidos también modifica la genotoxicidad de un compuesto, especialmente cuando el cromosoma con inversiones múltiples (cromosoma balanceador) se encuentra en heterocigosis.

3) La interacción del cambio en el orden de los genes, con la presencia de genes detrimentales, modifica de manera importante la genotoxicidad.

REFERENCIAS

1. Aardema MJ, Albertini S, Arni P, Henderson LM, Kirsch-Volders M, Mackay JM, Sarrif AM, Stringer DA, Taalman RDF. 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutation Res.* 410: 3–79.
2. Allfrey VG, Boffa LC and Vidali G (1977) Selective inhibition with sodium cyanate of protein synthesis in colon cancer cells. *Cancer (Phila)*, 40: 2692 – 2698.
3. Ando Y., E. Fuse and W. D, Figg. 2002. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clinical Cancer Research.* 8: 1964-1973.
4. Ashburner M. 1989. *Drosophila: a laboratory hand book*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Brooker J. 1999. *Genetics: Analisis and Principles*. Addison Wesley.
6. González CE y Ramos-Morales P (1997) Sodium Azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 389, 157-165.
7. Graf U, F Würigler, A Katz, H Frei, H Juon, C Hall, P Kale (1984) Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.
8. Greenspan, R.J (2004) *Fly Pushing. The theory and practice of Drosophila genetics*, 2a. ed., CSHL Press, New York, 191 pp.
9. Hansen J. M., K. K. Harris, M. A. Philbert and C. Harris. 2002. Thalidomide modulates nuclear redox status and preferentially depletes glutathione in rabbit limb versus rat limb. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 300 (3): 768-776.
10. Jiménez MI (1998) Efecto del cianato de sodio (Nakhon) sobre la actividad genotóxica del sulfato de níquel (NiSO₄) evaluado mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM, México, 84 pp.
11. Klug S. W y Cummings R. M (2000) *Concepts of Genetics*. 6a. Ed. Prentice Hall, Inc. 816 pp. ISBN 0-13-081626-4

12. Lea MA, Koch MR and Morris HP (1975) Tumor selective inhibition of incorporation of H-labeled amino acids into protein by cyanate. *Cancer Res.* 35: 2321 – 2326. Lindsley L. and G. Zimm. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc., U.K. 1142 pp
13. Lindsley DL, Grell EH (1972) *Genetic Variations of Drosophila melanogaster*, Carnegie Institution of Washington, Publication 627, United States Atomic Energy Commission, 471 pp.
14. Lindsley D. L., Zimm G.G. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Ed. Academic Press Inc. 1132 pp.
15. Muñoz, H. A. (1995) Relación entre el tiempo de acción de dos mutágenos y el tamaño de mancha inducidos en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 58pp.
16. Muñoz, H. A. (1997) Comparación de la respuesta inducida por mutágenos de referencia en células de las alas de *Drosophila melanogaster*, Tesis Maestría en Ciencias (Biología Celular), UNAM, México.
17. Parman T, Wiley MJ, Wells PG. 1999. Free Radical Mediated Oxidative DNA Damage in the Mechanism of Thalidomide Teratogenicity. *Nat. Med.* 5:582-585
18. Ramírez VA (2003) Detección de lesiones al ADN en *Drosophila melanogaster* por muestras de agua contaminada. Tesis (Maestría Biología Celular), Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, México, 97 pp.
19. Ramírez, R. A. 2003. Detección de lesiones al ADN en *Drosophila melanogaster* por muestras de agua contaminada. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 96 pp.
20. Ramos et al., (2005) Talidomida, congreso Sn Francisco.
21. Reist M. P., E. Francote, and B. Testa. 1998. Charal inversion and hydrolisis of thalidomide: mechanism and catálisis by bases and serum albumin, and charal stability of teratogenic metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 1521-1528.
22. Rivas, M. H. 1999. Participación de la reparación en el daño inducido por mutágenos con diferente actividad química: N-nitrosodimetilamina (DMN), Metil-Metano-Sulfonato (MMS), Colchicina, Azida de Sodio y Cloruro de Plomo. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM., México. 61 pp.

23. Rusell, P. J. 1998 Genetics. Harper Collins Publishers. Third Edition. 758pp
24. Sieber SM, Whang-Peng J, Botkin C, Knutsen T. 1978. Teratogenic and cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP-16-213 and VM-26) in mice. *Teratology* 18: 31-47.
25. The Merck Index. 1989 An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. eleventh edition. Merck & Co. Inc. USA.
26. Valencia R, JM Mason, RC Woodruff, S Zimmering (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila* III. Results of 48 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen.* 7: 325-348.
27. Vogel EW (1985) Summary report on the performance of the *Drosophila* assays, En: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby J de Serres Eds., Elsevier, pp 47-57.
28. Vogel, EW (1994) *Genotoxic Chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology*, Sylvius Laboratoro, Leiden, 66pp.
29. Zhu X., Y. P. Zhang, G. Klopman, H. S. Rosenkranz. 1999. Thalidomide and metabolites: indications of the absence of genotoxic carcinogenic potentials. *Mutation Research.* 425: 153-167.

Tabla II. Número de moscas recobradas e índices de Supervivencia de moscas expuestas a diversos compuestos

		[mM]	H	M	Total	IS	EE	I-H	I-M	Isx-H	EE	Isx-M	EE
Colchicina	<i>Canton-S</i>	0	448	463	911	1.00	0.00	0.49	0.51	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.0015	391	397	788	0.87	0.03	0.50	0.50	0.90	0.06	0.86	0.06
		0.003	339	419	758	0.85	0.10	0.44	0.56	0.81	0.06	0.90	0.06
		0.006	348	388	736	0.83	0.12	0.46	0.54	0.83	0.10	0.85	0.10
	<i>Basc</i>	0	350	364	714	1.00	0.00	0.49	0.51	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.0015	323	389	712	1.01	0.05	0.45	0.55	0.94	0.08	1.09	0.07
		0.003	342	348	690	0.98	0.09	0.50	0.50	0.99	0.09	0.98	0.11
		0.006	212	270	482	0.69	0.10	0.44	0.56	0.61	0.09	0.77	0.11
	<i>FM7</i>	0	129	52	181	1.00	0.00	0.70	0.30	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.0015	119	68	187	0.99	0.12	0.64	0.36	0.92	0.14	1.31	0.23
		0.003	84	39	123	0.62	0.17	0.76	0.24	0.63	0.14	0.62	0.26
		0.006	66	21	87	0.60	0.20	0.67	0.16	0.67	0.23	0.46	0.18
MMC	<i>Canton-S</i>	0	412	371	783	1.00	0.00	0.53	0.47	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.00063	336	397	733	0.94	0.04	0.46	0.54	0.82	0.11	1.12	0.11
		0.00125	428	448	876	1.13	0.03	0.49	0.51	1.04	0.08	1.25	0.08
		0.0025	408	399	807	1.03	0.03	0.51	0.49	0.99	0.05	1.10	0.05
	<i>Basc</i>	0	211	193	404	1.00	0.00	0.53	0.47	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.00063	197	225	422	1.08	0.14	0.47	0.53	0.97	0.15	1.23	0.17
		0.00125	152	198	350	0.87	0.05	0.44	0.56	0.73	0.08	1.07	0.14
		0.0025	182	179	361	0.90	0.08	0.50	0.50	0.86	0.08	1.00	0.17
	<i>FM7</i>	0	169	102	271	1.00	0.00	0.63	0.37	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.00063	165	82	247	0.92	0.05	0.67	0.33	0.97	0.05	0.87	0.12
		0.00125	131	70	201	0.77	0.14	0.63	0.37	0.77	0.15	0.82	0.22
		0.0025	97	47	144	0.57	0.09	0.68	0.32	0.61	0.12	0.49	0.11
MMS	<i>Canton-S</i>	0	352	366	718	1.00	0.00	0.49	0.51	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.0025	323	323	646	0.91	0.04	0.50	0.50	0.93	0.05	0.90	0.05
		0.005	311	347	658	0.94	0.04	0.47	0.53	0.89	0.09	0.99	0.09
		0.01	303	287	590	0.82	0.04	0.51	0.49	0.86	0.03	0.78	0.03
	<i>Basc</i>	0	271	283	554	1.00	0.00	0.49	0.51	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.0025	234	285	519	0.94	0.06	0.45	0.55	0.88	0.09	1.01	0.05
		0.005	267	293	560	1.00	0.05	0.48	0.52	1.00	0.10	1.02	0.05
		0.01	246	265	511	0.94	0.06	0.48	0.52	0.94	0.09	0.95	0.06
	<i>FM7</i>	0	182	118	300	1.00	0.00	0.60	0.40	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.0025	200	123	323	1.31	0.35	0.64	0.36	1.33	0.28	1.36	0.50
		0.005	156	103	259	1.05	0.29	0.61	0.39	1.04	0.26	1.08	0.35
		0.01	233	129	362	1.44	0.36	0.66	0.34	1.52	0.31	1.38	0.47

H, Hembra; M, Macho; IS, Índice de Supervivencia; EE, Error Estandar; I-H, Índice de Hembras;
 I-M, Índice de Machos; Isx-H, Índice de Supervivencia por Fenotipo Hembra;
 Isx-M, Índice de Supervivencia por Fenotipo Macho.

Tabla II. Número de moscas recobradas e índices de Supervivencia de moscas expuestas a diversos compuestos

		[mM]	H	M	Total	IS	EE	I-H	I-M	Isx-H	EE	Isx-M	EE
NaN3	<i>Canton-S</i>	0	315	371	686	1.00	0.00	0.44	0.56	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.095	271	297	568	1.00	0.26	0.49	0.51	1.12	0.24	0.91	0.24
		0.19	154	199	353	0.68	0.29	0.47	0.53	0.71	0.28	0.67	0.28
		0.38	75	90	165	0.33	0.16	0.33	0.51	0.41	0.13	0.30	0.13
	<i>Basc</i>	0	379	380	759	1.00	0.00	0.50	0.50	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.095	292	245	537	0.68	0.08	0.53	0.47	0.74	0.10	0.63	0.06
		0.19	172	178	350	0.39	0.15	0.51	0.49	0.38	0.15	0.41	0.17
		0.38	121	136	257	0.29	0.13	0.24	0.26	0.26	0.12	0.31	0.14
	<i>FM7</i>	0	218	61	279	1.00	0.00	0.76	0.24	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.095	195	63	258	0.88	0.15	0.75	0.25	0.87	0.12	1.40	0.64
		0.19	116	24	140	0.36	0.13	0.70	0.14	0.38	0.13	0.32	0.15
		0.38	60	24	84	0.21	0.10	0.35	0.15	0.18	0.09	0.44	0.24
NaOCN	<i>Canton-S</i>	0	499	488	987	1.00	0.00	0.51	0.49	1.00	0.00	1.00	0.00
		2.5	448	488	936	0.95	0.05	0.48	0.52	0.91	0.06	1.01	0.06
		5	464	504	968	0.98	0.06	0.48	0.52	0.93	0.09	1.05	0.09
		10	402	471	873	0.91	0.09	0.46	0.54	0.83	0.10	0.99	0.10
	<i>Basc</i>	0	439	445	884	1.00	0.00	0.50	0.50	1.00	0.00	1.00	0.00
		2.5	387	405	792	0.91	0.06	0.49	0.51	0.90	0.08	0.95	0.09
		5	407	420	827	0.95	0.06	0.49	0.51	0.94	0.07	1.00	0.12
		10	407	392	799	0.92	0.06	0.51	0.49	0.94	0.05	0.93	0.11
	<i>FM7</i>	0	261	121	382	1.00	0.00	0.68	0.32	1.00	0.00	1.00	0.00
		2.5	357	133	490	1.38	0.16	0.73	0.27	1.52	0.21	1.13	0.13
		5	316	106	422	1.31	0.29	0.75	0.25	1.46	0.31	1.01	0.29
		10	171	53	224	0.68	0.15	0.77	0.23	0.82	0.21	0.45	0.07
THL	<i>Canton-S</i>	0	381	431	812	1.00	0.00	0.48	0.52	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.00015	393	414	807	1.01	0.06	0.49	0.51	1.03	0.10	1.00	0.10
		0.00061	403	400	803	0.97	0.07	0.50	0.50	1.05	0.03	0.93	0.03
		0.0024	408	394	802	1.02	0.12	0.50	0.50	1.09	0.12	0.97	0.12
	<i>Basc</i>	0	323	295	618	1.00	0.00	0.53	0.47	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.00015	334	315	649	1.10	0.11	0.52	0.48	1.06	0.08	1.18	0.20
		0.00061	295	311	606	0.99	0.08	0.49	0.51	0.93	0.09	1.08	0.09
		0.0024	290	290	580	0.94	0.09	0.51	0.49	0.91	0.10	0.99	0.11
	<i>FM7</i>	0	284	129	413	1.00	0.00	0.69	0.31	1.00	0.00	1.00	0.00
		0.00015	278	127	405	1.01	0.06	0.67	0.33	1.01	0.10	1.07	0.13
		0.00061	287	131	418	1.11	0.14	0.66	0.34	1.06	0.11	1.25	0.25
		0.0024	288	132	420	1.05	0.05	0.66	0.34	1.00	0.05	1.21	0.20

H, Hembra; M, Macho; IS, Índice de Supervivencia; EE, Error Estandar; I-H, Índice de Hembras;
I-M, Índice de Machos; Isx-H, Índice de Supervivencia por Fenotipo Hembra;
Isx-M, Índice de Supervivencia por Fenotipo Macho.

Fig. 5 Índice de sobrevivencia de moscas expuestas a Colchicina

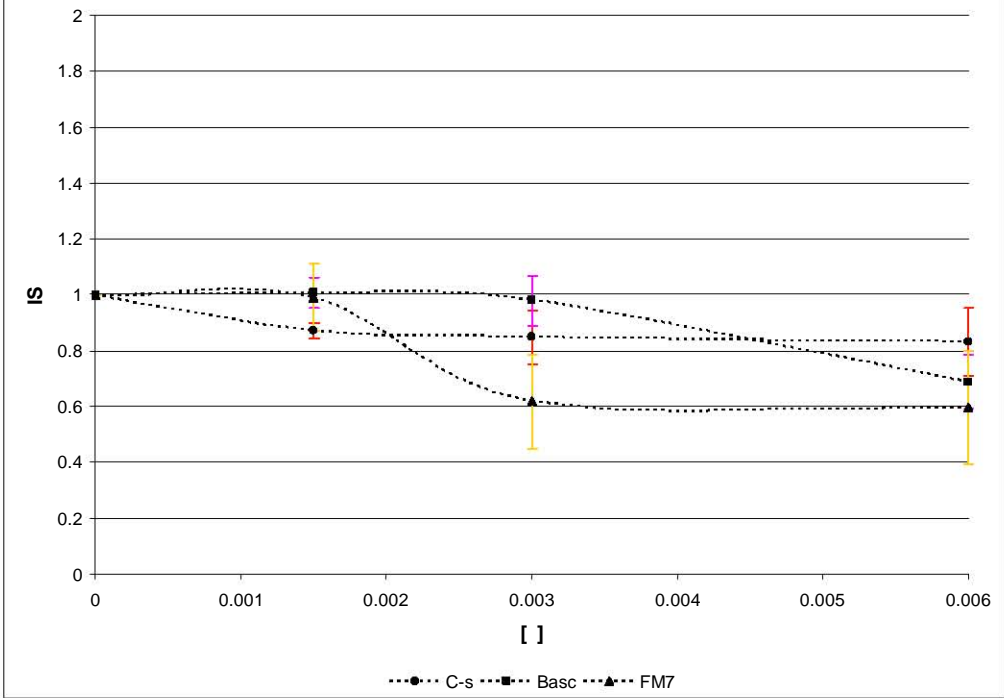


Fig. 6 IS por fenotipos (Isx) de moscas tratadas con Colchicina

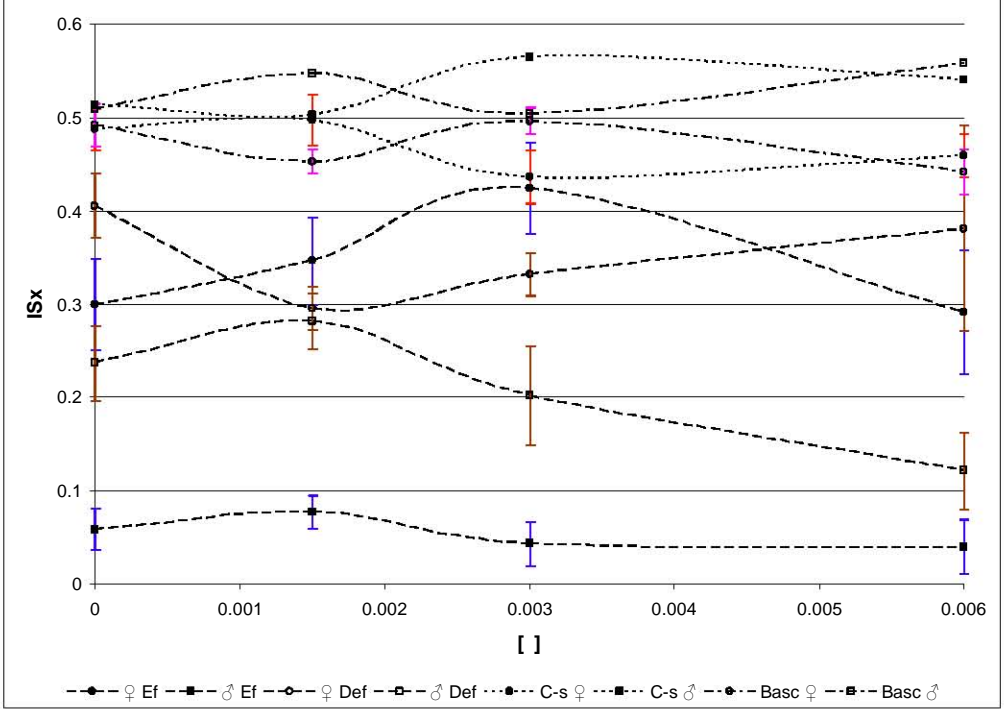


Fig. 7 Índice de sobrevivencia de moscas expuestas a MMC

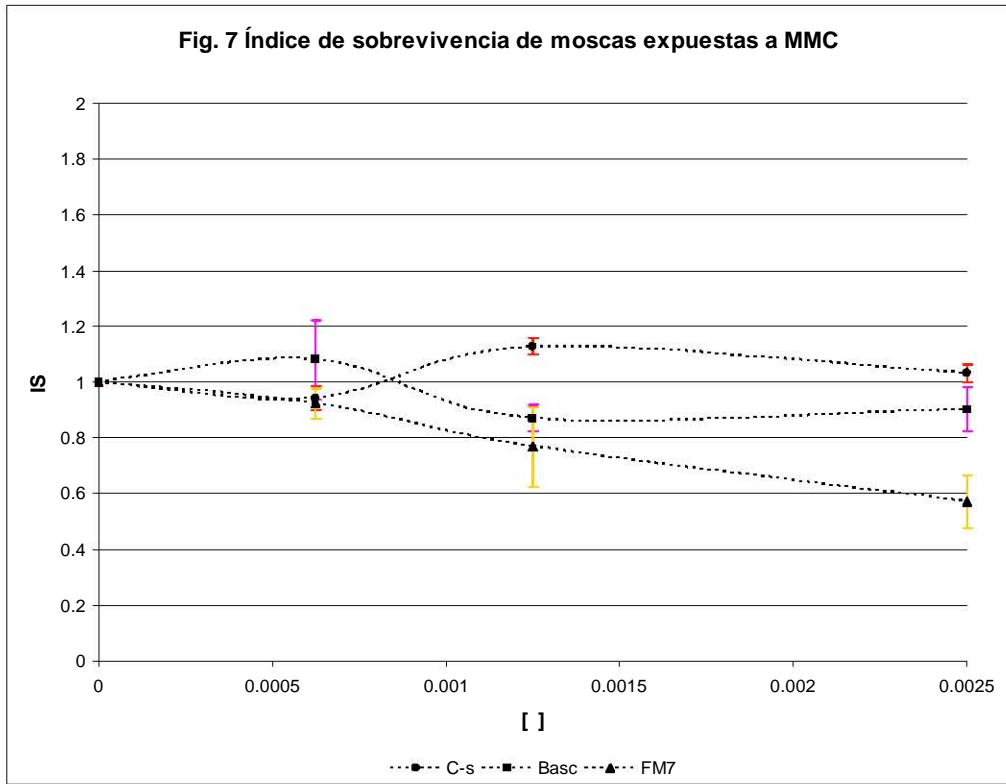
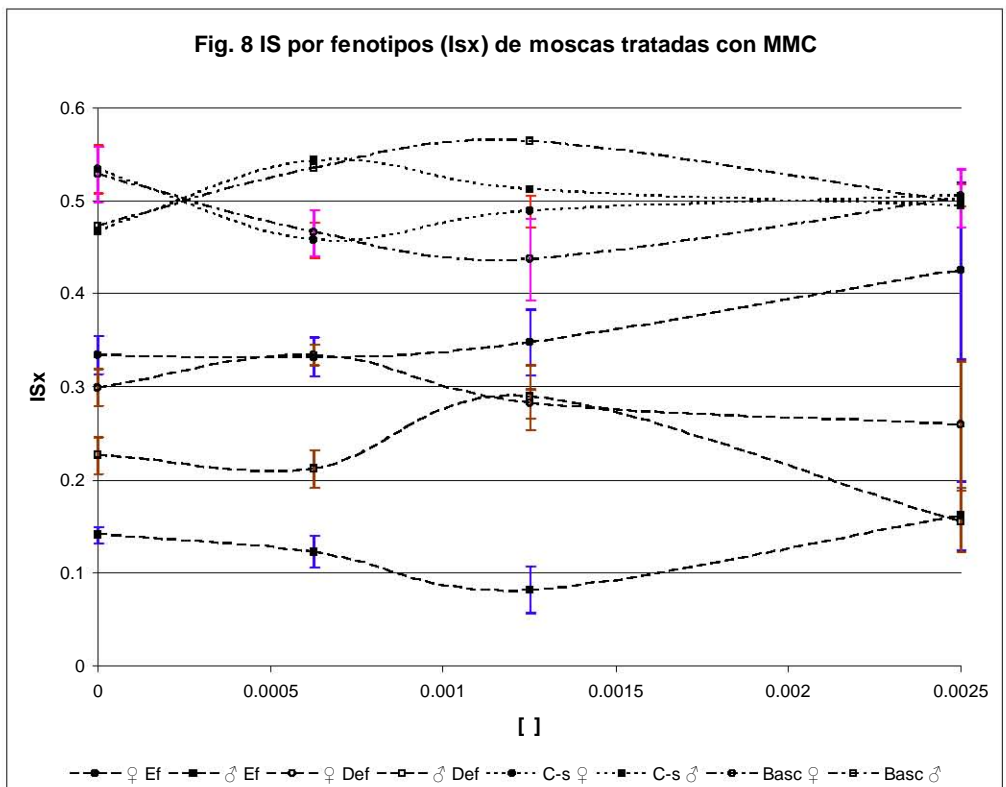


Fig. 8 IS por fenotipos (Isx) de moscas tratadas con MMC



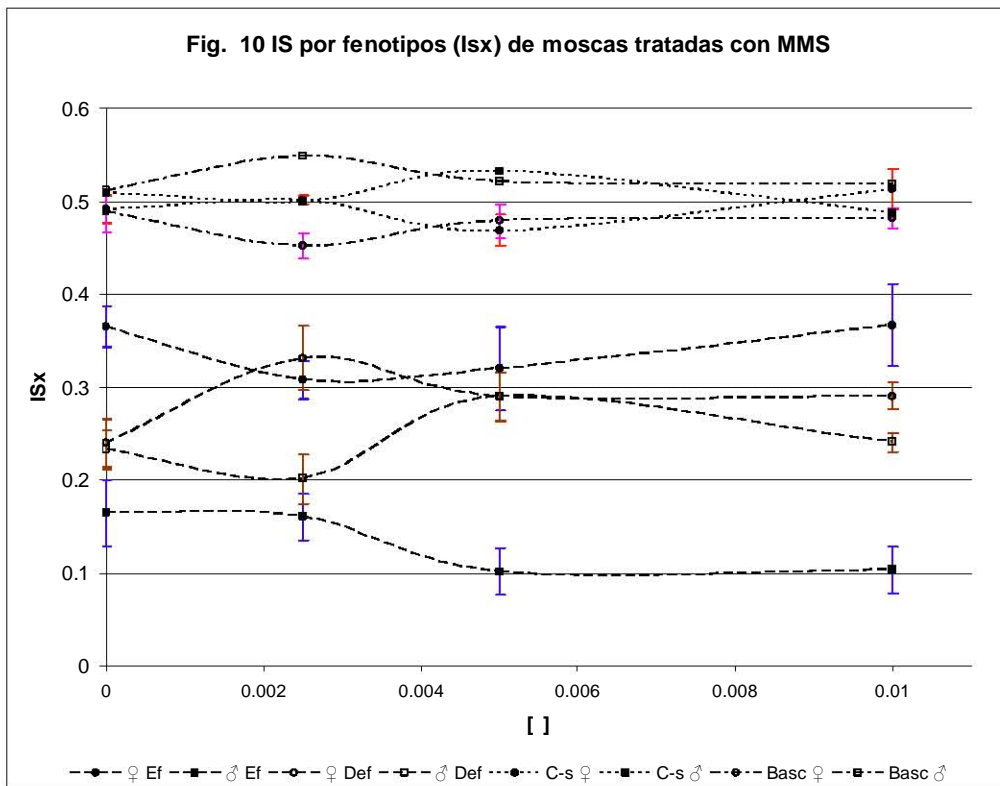
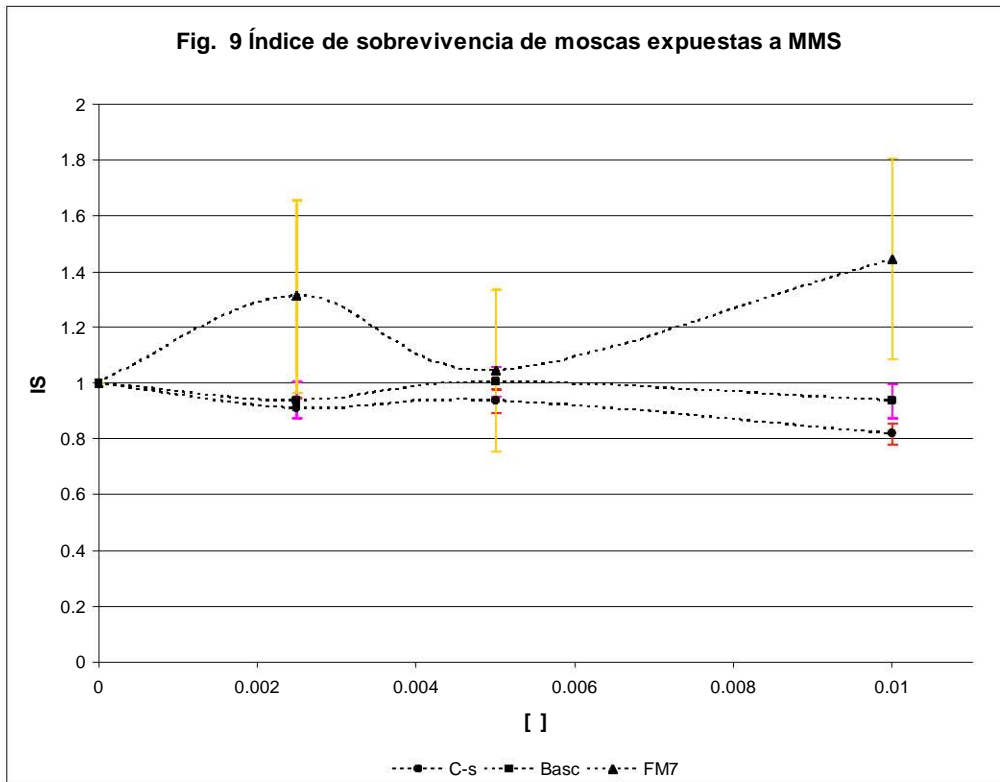


Fig. 11 Índice de sobrevivencia de moscas expuestas a NaN3

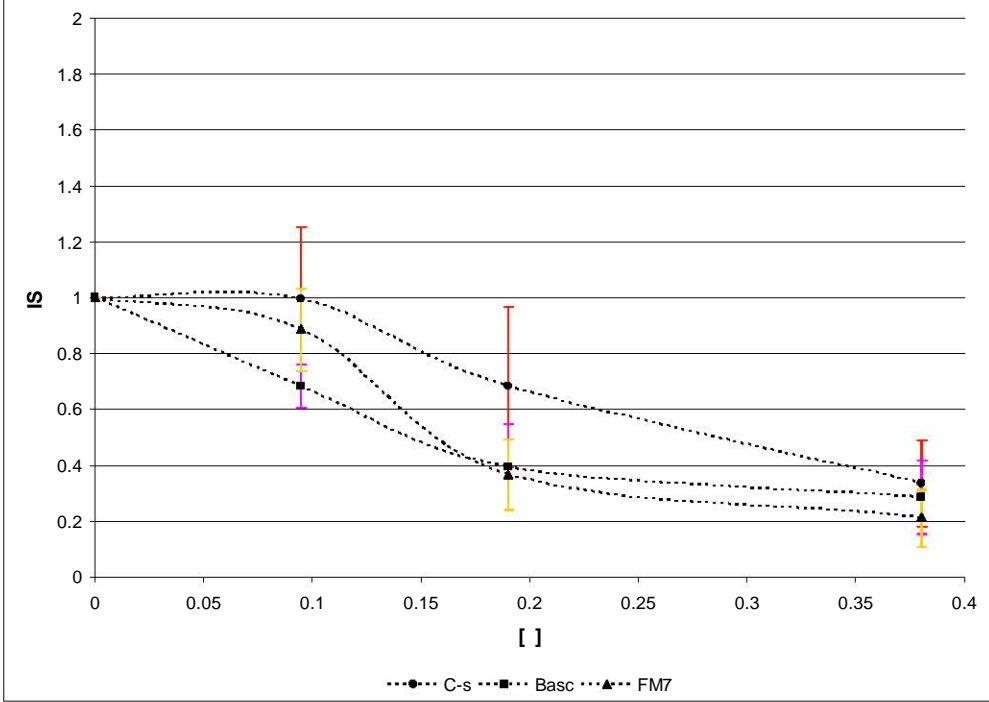


Fig. 12 IS por fenotipos (ISx) de moscas tratadas con NaN3

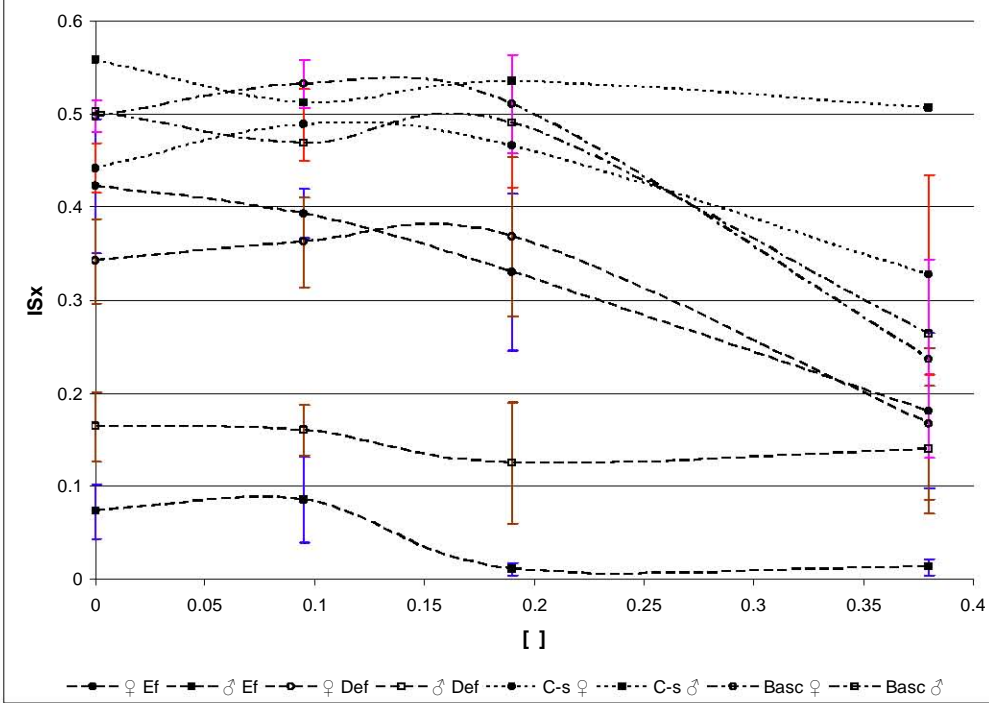


Fig. 13 Índice de sobrevivencia de moscas expuestas a NaOCN

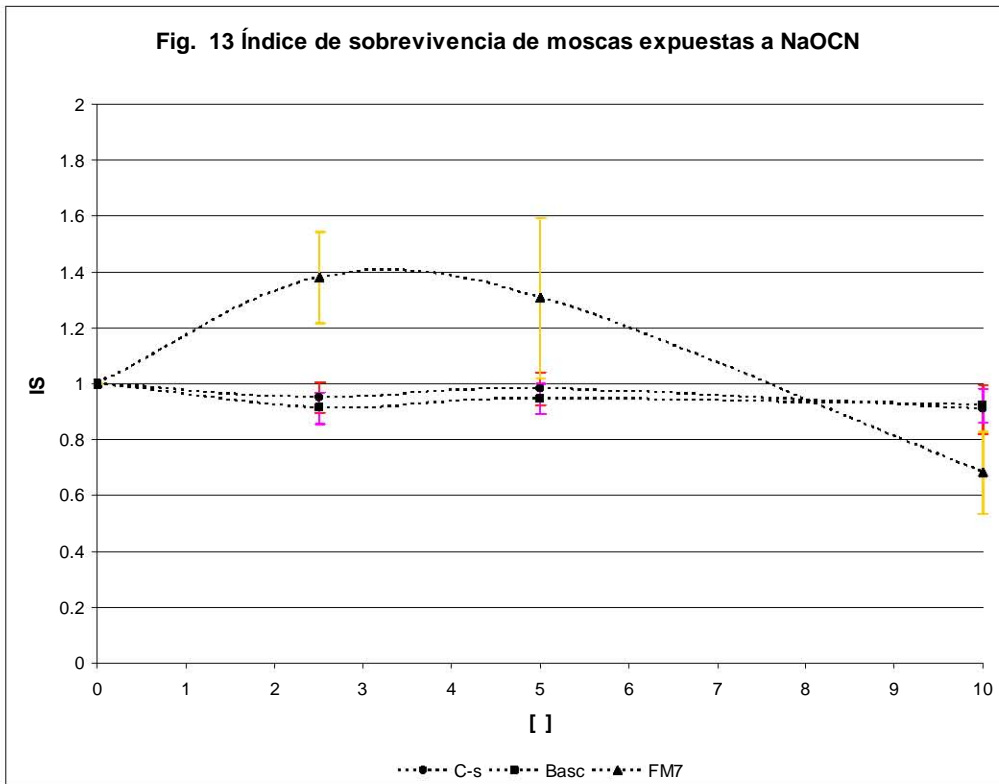
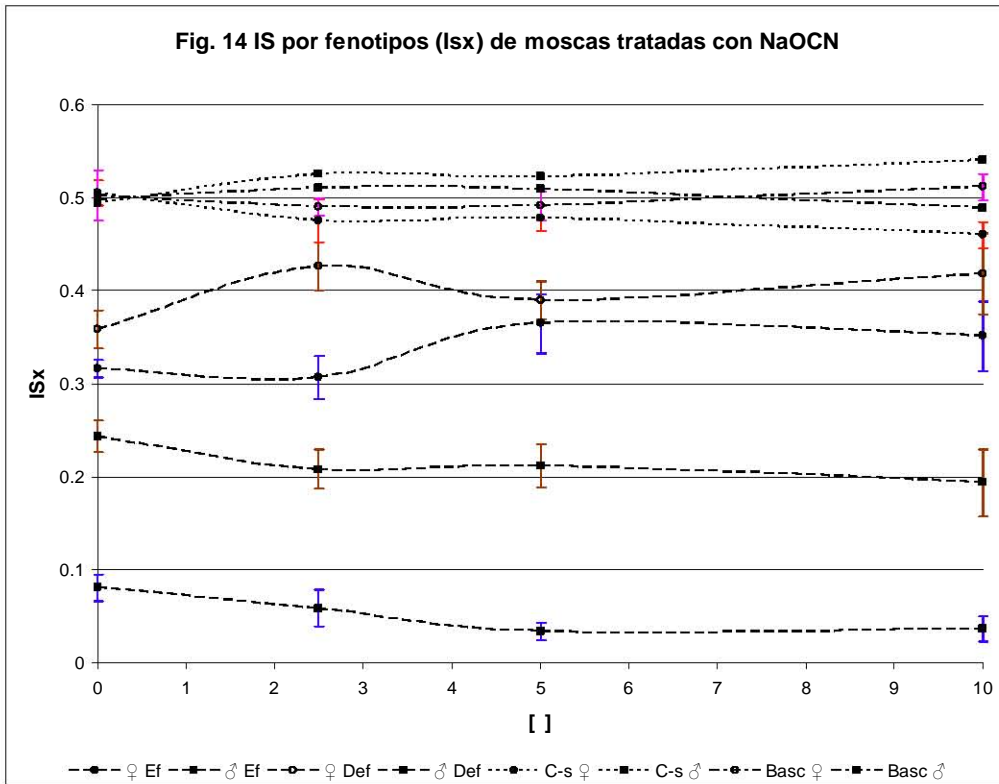
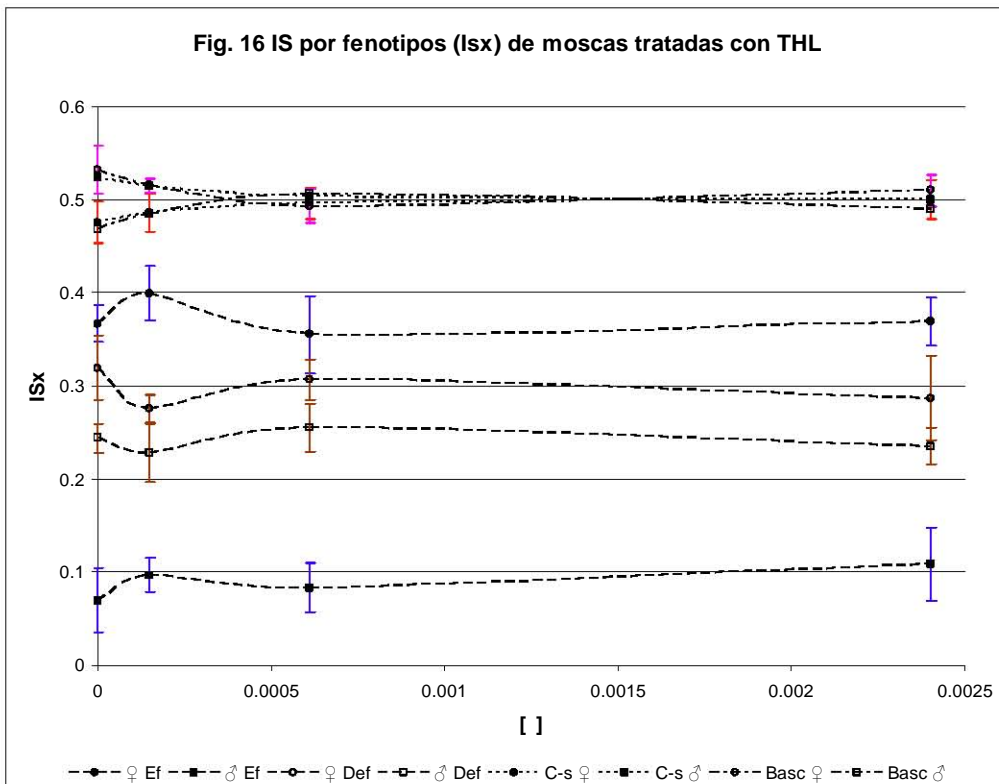
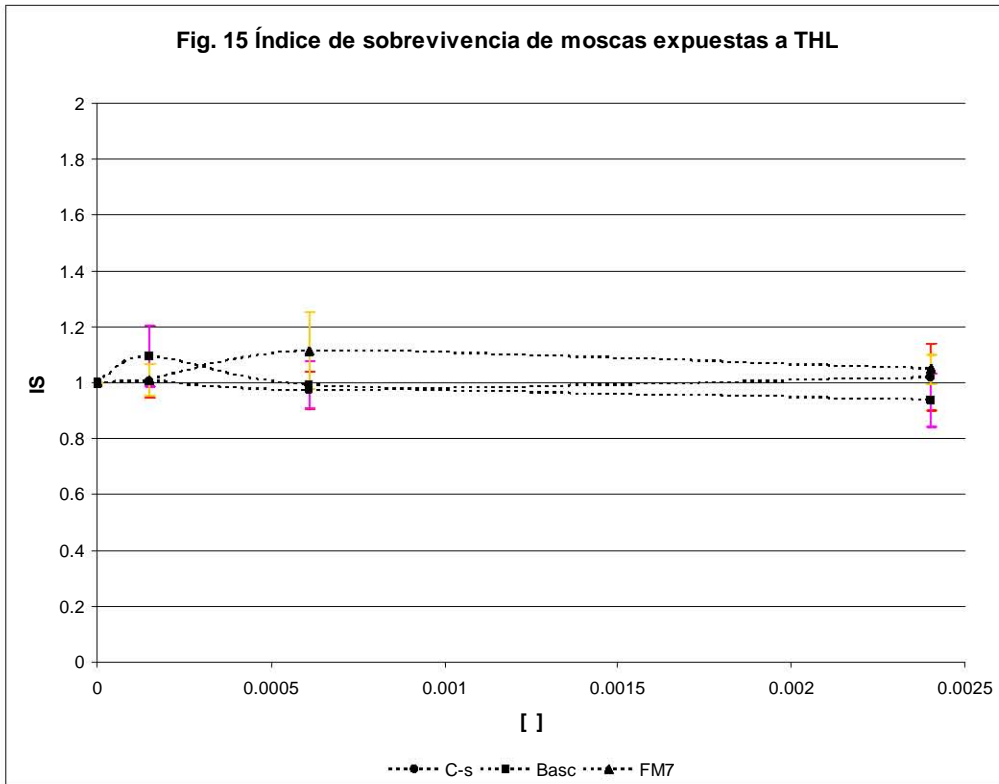


Fig. 14 IS por fenotipos (Isx) de moscas tratadas con NaOCN





ANEXO 1. Resultados del análisis estadístico

Resumen ANOVA Concentración-Línea Moscas para Colchicina

ORIGEN	LINEA					
	GL	SS	MS	F	F critica	p
Concentración	3	0.985550106	0.328516692	5.038489342	2.76	0.003519212
Línea	2	0.17791149	0.088955745	1.364322066	3.15	0.263366491
Interacción	6	0.458594203	0.07643237	1.172249913	2.25	0.333214015
Error	60	3.912085533	0.065201424			
Total	71					

Prueba de Tukey para Línea de Moscas para Colchicina

LINEA	C-s	Basc	FM7
	.8870277	.9180850	.8005953
C-s		0.907004178	0.474089444
Basc	0.907004178		0.256205142
FM7	0.474089444	0.256205142	

Prueba de Tukey para Concentración para Colchicina

CONC	1	2	3	4
	1.000000	.9557343	.8139937	.7045494
1		0.954024136	0.139164209	0.005307317
2	0.954024136		0.350970924	0.022862911
3	0.139164209	0.350970924		0.575507402
4	0.005307317	0.022862911	0.575507402	

Resumen ANOVA Concentración-Fenotipo para Colchicina

ORIGEN	Fenotipo					
	GL	SS	MS	F	F critica	p
Concentración	3	0.015625	0.005208333	0.64729929		0.585749805
Fenotipo	7	4.735584736	0.676512122	84.07791901		0
Interacción	21	0.237095088	0.011290242	1.403167844		0.123651899
Error	160	1.287400365	0.008046252			
Total	191					

Prueba de Tukey para Fenotipos para Colchicina

FENOTIPO	C-s H	C-s M	Basc H	Basc M	H Ef	M Ef	H Def	M Def
	.4697770	.5302231	.4705312	.5294688	.3400797	.0546205	.3533729	.2102602
C-s H		0.274766505	1	0.29053396	4.51803E-05	3.21269E-05	0.000209808	3.21269E-05
C-s M	0.274766505		0.29053396	1	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc H	1	0.29053396		0.306814373	4.3273E-05	3.21269E-05	0.000186801	3.21269E-05
Basc M	0.29053396	1	0.306814373		3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
H Ef	4.51803E-05	3.21269E-05	4.3273E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	0.99960041	4.48823E-05
M Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	3.21865E-05
H Def	0.000209808	3.21269E-05	0.000186801	3.21269E-05	0.99960041	3.21269E-05		3.28422E-05
M Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	4.48823E-05	3.21865E-05	3.28422E-05	

Prueba de Tukey para Concentración para Colchicina

CONC	1	2	3	4
	.3750000	.3750000	.3750000	.3541667
1		1	1	0.666077137
2	1		1	0.666077137
3	1	1		0.666077137
4	0.666077137	0.666077137	0.666077137	

Resumen ANOVA Concentración-Línea Moscas para MMC

ORIGEN	LINEA					
	GL	SS	MS	F	F critica	p
Concentración	3	0.302036434	0.100678809	3.130599022		0.03211851
Línea	2	0.558174551	0.279087275	8.678195		0.000489386
Interacción	6	0.620975256	0.103495881	3.218195677		0.008308742
Error	60	1.92957592	0.0321596			
Total	71					

Prueba de Tukey para Línea de Moscas para MMC

LINEA	C-s	Basc	FM7
	1.025402	.9632609	.8154748
C-s		0.457672834	0.000524402
Basc	0.457672834		0.016148448
FM7	0.000524402	0.016148448	

Prueba de Tukey para Concentración para MMC

CONC	1	2	3	4
	1.000000	.9823254	.9222922	.8342332
1		0.990999162	0.566649079	0.036272883
2	0.990999162		0.747579813	0.07394284
3	0.566649079	0.747579813		0.459956884
4	0.036272883	0.07394284	0.459956884	

Resumen ANOVA Concentración-Fenotipo para MMC

ORIGEN	Fenotipo					
	GL	SS	MS	F	F critica	p
Concentración	3	2.00778E-32	6.69261E-33	1.06125E-30		1
Fenotipo	7	3.734164953	0.533452094	84.58998871		0
Interacción	21	0.221280649	0.010537174	1.670889258		0.040403176
Error	160	1.009012341	0.006306327			
Total	191					

Prueba de Tukey para Fenotipos para MMC

FENOTIPO	C-s H	C-s M	Basc H	Basc M	H Ef	M Ef	H Def	M Def
	.4962749	.5037251	.4828480	.5171521	.3594771	.1265697	.2934214	.2205319
C-s H		0.999981761	0.999049842	0.985153854	3.21865E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
C-s M	0.999981761		0.985153854	0.999049842	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc H	0.999049842	0.985153854		0.809735179	3.37362E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc M	0.985153854	0.999049842	0.809735179		3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
H Ef	3.21865E-05	3.21269E-05	3.37362E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	0.076328397	3.21865E-05
M Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	0.001093745
H Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	0.076328397	3.21269E-05		0.031877637
M Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21865E-05	0.001093745	0.031877637	

Prueba de Tukey para Concentración para MMC

CONC	1	2	3	4
	.3750000	.3750000	.3750000	.3750000
1		1	1	1
2	1		1	1
3	1	1		1
4	1	1	1	

Resumen ANOVA Concentración-Línea Moscas para MMS

ORIGEN	GL	LINEA				p
		SS	MS	F	F critica	
Concentración	3	0.069629371	0.023209792	0.1329927		0.940046906
Línea	2	1.099361897	0.549680948	3.149685621		0.050032847
Interacción	6	0.871242285	0.145207047	0.832040131		0.549924493
Error	60	10.47115803	0.1745193			
Total	71					

Prueba de Tukey para Línea de Moscas para MMS

LINEA	C-s	Basc	FM7
	.9154134	.9698878	1.200497
C-s		0.893900812	0.054887593
Basc	0.893900812		0.144130707
FM7	0.054887593	0.144130707	

Prueba de Tukey para Concentración para MMS

CONC	1	2	3	4
	1.000000	1.052594	.9958015	1.066002
1		0.981538177	0.999991298	0.964589655
2	0.981538177		0.976941049	0.99971664
3	0.999991298	0.976941049		0.957860827
4	0.964589655	0.99971664	0.957860827	

Resumen ANOVA Concentración-Fenotipo para MMS

ORIGEN	GL	Fenotipo			F	F critica	p
		SS	MS	F			
Concentración	3	1.66111E-32	5.53705E-33	1.71839E-30		1	
Fenotipo	7	3.594308615	0.513472676	159.3536072		0	
Interacción	21	0.110066883	0.00524128	1.626604557		0.049085312	
Error	160	0.515555441	0.003222222				
Total	191						

Prueba de Tukey para Fenotipos para MMS

FENOTIPO	C-s H	C-s M	Basc H	Basc M	H Ef	M Ef	H Def	M Def
	.4933039	.5066961	.4751497	.5248503	.3394865	.1319703	.2876371	.2409061
C-s H		0.992216647	0.955345511	0.533397794	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
C-s M	0.992216647		0.533397794	0.955345511	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc H	0.955345511	0.533397794		0.049699008	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc M	0.533397794	0.955345511	0.049699008		3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
H Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	0.033445418	3.21865E-05
M Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	3.21269E-05
H Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	0.033445418	3.21269E-05		0.082715571
M Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21865E-05	3.21269E-05	0.082715571	

Prueba de Tukey para Concentración para MMS

CONC	1	2	3	4
	.3750000	.3750000	.3750000	.3750000
1		1	1	1
2	1		1	1
3	1	1		1
4	1	1	1	

Resumen ANOVA Concentración-Línea Moscas para NaN3

ORIGEN	GL	LINEA				F critica	p
		SS	MS	F			
Concentración	3	5.977449417	1.992483139	14.91136169		2.30499E-07	
Línea	2	0.36687246	0.18343623	1.372801542		0.26123929	
Interacción	6	0.349631488	0.058271915	0.436095834		0.851867795	
Error	60	8.017308235	0.133621812				
Total	71						

Prueba de Tukey para Línea de Moscas para NaN3

LINEA	C-s	Basc	FM7
	.7530219	.5910385	.6150165
C-s		0.282090008	0.396516979
Basc	0.282090008		0.972023904
FM7	0.396516979	0.972023904	

Prueba de Tukey para Concentración para NaN3

CONC	1	2	3	4
	1.000000	.8544334	.4807234	.2769457
1		0.632648706	0.000542879	0.000155866
2	0.632648706		0.016736686	0.000223219
3	0.000542879	0.016736686		0.347206712
4	0.000155866	0.000223219	0.347206712	

Resumen ANOVA Concentración-Fenotipo para NaN3

ORIGEN	GL	Fenotipo				F critica	p
		SS	MS	F			
Concentración	3	0.708333313	0.236111104	10.30619431		3.06E-06	
Fenotipo	7	4.493125916	0.641875148	28.01769829		6.67423E-25	
Interacción	21	0.37704125	0.017954346	0.78370291		0.736392379	
Error	160	3.665540934	0.022909632				
Total	191						

Prueba de Tukey para Fenotipos para NaN3

FENOTIPO	C-s H	C-s M	Basc H	Basc M	H Ef	M Ef	H Def	M Def
	.4306149	.5277184	.4441273	.4308727	.3312152	.0453420	.3096425	.1471337
C-s H		0.338086307	0.999987006	1	0.307468355	3.21269E-05	0.102944791	3.21269E-05
C-s M	0.338086307		0.541746497	0.341618121	0.000208199	3.21269E-05	4.64916E-05	3.21269E-05
Basc H	0.999987006	0.541746497		0.999988616	0.161560476	3.21269E-05	0.043501675	3.21269E-05
Basc M	1	0.341618121	0.999988616		0.304120958	3.21269E-05	0.101391077	3.21269E-05
H Ef	0.307468355	0.000208199	0.161560476	0.304120958		3.21269E-05	0.999691546	0.000679374
M Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21865E-05	0.277254641
H Def	0.102944791	4.64916E-05	0.043501675	0.101391077	0.999691546	3.21865E-05		0.004933953
M Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	0.000679374	0.277254641	0.004933953	

Prueba de Tukey para Concentración para NaN3

CONC	1	2	3	4
	.3750000	.3750000	.3541667	.2291667
1		1	0.906851709	2.09212E-05
2	1		0.906851709	2.09212E-05
3	0.906851709	0.906851709		0.000308394
4	2.09212E-05	2.09212E-05	0.000308394	

Resumen ANOVA Concentración-Línea Moscas para NaOCN

ORIGEN	LINEA					
	GL	SS	MS	F	F crítica	p
Concentración	3	0.704995692	0.234998569	3.052337885		0.035240788
Línea	2	0.312253773	0.156126887	2.027893305		0.140535623
Interacción	6	1.184258461	0.1973764	2.563673019		0.028149778
Error	60	4.619381428	0.076989695			
Total	71					

Prueba de Tukey para Línea de Moscas para NaOCN

LINEA	C-s	Basc	FM7
	.9604075	.9448336	1.091667
C-s		0.979464114	0.237590253
Basc	0.979464114		0.167676866
FM7	0.237590253	0.167676866	

Prueba de Tukey para Concentración para NaOCN

CONC	1	2	3	4
	1.000000	1.081108	1.077718	.8370518
1		0.816816151	0.835096955	0.301805258
2	0.816816151		0.999984324	0.050550938
3	0.835096955	0.999984324		0.055221736
4	0.301805258	0.050550938	0.055221736	

Resumen ANOVA Concentración-Fenotipo para NaOCN

ORIGEN	Fenotipo					
	GL	SS	MS	F	F crítica	p
Concentración	3	5.12779E-32	1.70926E-32	6.24044E-30		1
Fenotipo	7	4.683987141	0.669141054	244.3003235		0
Interacción	21	0.064205535	0.003057406	1.116245031		0.336319596
Error	160	0.438241601	0.00273901			
Total	191					

Prueba de Tukey para Fenotipos para NaOCN

FENOTIPO	C-s H	C-s M	Basc H	Basc M	H Ef	M Ef	H Def	M Def
	.4795733	.5204268	.4984958	.5015042	.3347414	.0527798	.3982297	.2142490
C-s H		0.121194243	0.915939569	0.832921386	3.21269E-05	3.21269E-05	3.37362E-05	3.21269E-05
C-s M	0.121194243		0.832921386	0.915939569	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc H	0.915939569	0.832921386		0.999999404	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc M	0.832921386	0.915939569	0.999999404		3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
H Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	0.000710487	3.21269E-05
M Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	3.21269E-05
H Def	3.37362E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	0.000710487	3.21269E-05		3.21269E-05
M Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	

Prueba de Tukey para Concentración para NaOCN

CONC	1	2	3	4
	.3750000	.3750000	.3750000	.3750000
1		1	1	1
2	1		1	1
3	1	1		1
4	1	1	1	

Resumen ANOVA Concentración-Línea Moscas para THL

ORIGEN	LINEA					
	GL	SS	MS	F	F critica	p
Concentración	3	0.019387864	0.006462621	0.170246273		0.916074157
Línea	2	0.026296644	0.013148322	0.346369177		0.708656132
Interacción	6	0.113464884	0.018910814	0.498171836		0.807244301
Error	60	2.277625561	0.037960425			
Total	71					

Prueba de Tukey para Línea de Moscas para THL

LINEA	C-s	Basc	FM7
	.9999831	1.006806	1.043502
C-s		0.992009103	0.720534086
Basc	0.992009103		0.791785955
FM7	0.720534086	0.791785955	

Prueba de Tukey para Concentración para THL

CONC	1	2	3	4
	1.000000	1.037989	1.027488	1.001578
1		0.936333001	0.974342108	0.99999541
2	0.936333001		0.998550236	0.943346798
3	0.974342108	0.998550236		0.978368461
4	0.99999541	0.943346798	0.978368461	

Resumen ANOVA Concentración-Fenotipo para THL

ORIGEN	Fenotipo					
	GL	SS	MS	F	F critica	p
Concentración	3	1.21334E-32	4.04445E-33	1.1075E-30		1
Fenotipo	7	4.047575951	0.578225076	158.3368073		0
Interacción	21	0.034591831	0.00164723	0.451065063		0.982092142
Error	160	0.584298849	0.003651868			
Total	191					

Prueba de Tukey para Fenotipos para THL

FENOTIPO	C-s H	C-s M	Basc H	Basc M	H Ef	M Ef	H Def	M Def
	.4895087	.5104913	.5125581	.4874419	.3727109	.0895266	.2970837	.2406788
C-s H		0.931393147	0.891083479	1	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
C-s M	0.931393147		1	0.891083479	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc H	0.891083479	1		0.838796794	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
Basc M	1	0.891083479	0.838796794		3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05
H Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	0.000406682	3.21269E-05
M Ef	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05		3.21269E-05	3.21269E-05
H Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	0.000406682	3.21269E-05		0.026900351
M Def	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	3.21269E-05	0.026900351	

Prueba de Tukey para Concentración para THL

CONC	1	2	3	4
	.3750000	.3750000	.3750000	.3750000
1		1	1	1
2	1		1	1
3	1	1		1
4	1	1	1	