



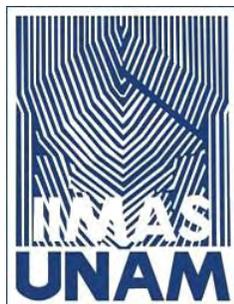
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATEMÁTICAS APLICADAS
Y EN SISTEMAS

“USO DE UN DISEÑO
FACTORIAL ASIMÉTRICO
($2^k \times 3^m$) EN EL ANÁLISIS DE
UN EXPERIMENTO
MUTAGÉNICO”

T E S I S I N A
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA :
ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA APLICADA
P R E S E N T A:
ALEJANDRO FRÍAS VILLEGAS

ASESOR:
M. EN C. PATRICIA ISABEL ROMERO MARES



CIUDAD UNIVERSITARIA

JUNIO 2009



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
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.

RECONOCIMIENTOS

Académicos

A la M. en C. Patricia Isabel Romero Mares por la dirección del presente trabajo y por todo el apoyo brindado durante la realización del mismo.

A la M. en C. Leticia Eugenia Gracia Medrano Valdemar por la revisión minuciosa de la tesina y sus valiosos comentarios.

Al Dr. Ignacio Méndez Ramírez por la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Carlos Díaz Ávalos por la revisión exhaustiva del este trabajo.

Al M. en C. Armando Cervantes Sandoval por la revisión de la tesina y por sus acertados comentarios.

Al Dr. Javier Espinosa Aguirre por su valiosa asesoría para la realización de los ensayos mutagénicos y en la interpretación de los resultados desde la perspectiva biológica.

A la M. en C. María Concepción Moreno Zenteno por su valiosa asesoría en el diseño del experimento y en la interpretación de los resultados desde la perspectiva bioquímica.

Técnicos

A la M. en C. María Concepción Moreno Zenteno por su apoyo y asesoría en la realización de los ensayos mutagénicos, en particular, en el manejo de las enzimas bacterianas.

Al Dr. Javier Espinosa Aguirre por proporcionarme todas las facilidades (en lo operativo y en lo material) para la realización de fase experimental del presente trabajo.

Institucionales

Al Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas de la Universidad Nacional Autónoma de México dónde curse mis estudios de Especialización.

Al Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades otorgadas para la realización de la fase experimental del presente trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres Gloria Villegas y Jorge Frías por su apoyo incondicional.

A mi hermano Jorge Frías por el apoyo que me ha brindado en todo momento.

A mi hermana Gabriela Frías y a su esposo David Sanders.

A Katy.....con mucho cariño.

A mi amiga Conny Moreno por todo lo que hemos compartido.

A Gustavo Hernández por su amistad incondicional.

A Roberto Márquez por su amistad y sus valiosos consejos.

A la Universidad Nacional.....dónde pronto he de regresar.

ÍNDICE

I.-INTRODUCCIÓN	3
1.1 Diseños Factoriales.....	3
1.1.1 Fundamentos de los Diseños Factoriales.....	3
1.1.2 Tipos de Diseños Factoriales.....	4
1.1.3 La Importancia de los Diseños Factoriales en la Experimentación.....	6
2.1 El Ensayo de Mutación Reversa con la Bacteria <i>Salmonella typhimurium</i>	7
2.1.1 Fundamentos de la Prueba.....	7
2.1.2 Enzimas y Mutágenos.....	9
II.-ANTECEDENTES	11
III.-OBJETIVOS	13
IV.-MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Diseño Experimental	14
4.1.1 Tipo de Estudio.....	14
4.1.2 Factores de Confusión, Validez Interna y Externa	14
4.1.3 Elección del Diseño: Niveles, Factores y Variable de Interés.....	15
4.1.4 Cálculo del Tamaño de Muestra y Aleatorización	16
4.2 El Ensayo de Mutación Reversa con la Bacteria <i>Salmonella typhimurium</i>	22
4.3 Procedimiento de Análisis Estadístico	24
V.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1 Análisis del Experimento con la Variable de Respuesta Transformada con Raíz Cuadrada.....	29
5.1.1 Verificación de los Supuestos	35
VI.-CONCLUSIONES	38
APÉNDICE 1.- Prueba de Durbin-Watson	41
APÉNDICE 2.- Transformación de Box y Cox	43
ANEXO I.-Corridas en Orden Aleatorio y Resultados del Experimento (JMP)	45
ANEXO II.-Número de Colonias Revertantes para los Controles del Experimento ...	46
ANEXO III.- Análisis de Resultados sin Transformar la Variable de Respuesta	47
ANEXO IV.-Análisis de Resultados Aplicando una Transformación Logarítmica (Ln) a la Variable de Respuesta	56
ANEXO V.- Análisis de Resultados Aplicando una Transformación de Box-Cox a la Variable de Respuesta	59
REFERENCIAS	64

RESUMEN

La experimentación tiene un papel fundamental en todos los campos de la investigación y el desarrollo, siendo su objetivo principal la obtención de *información de calidad*. De acuerdo con esto, es indispensable contar con un diseño y análisis riguroso de los experimentos, principalmente en las áreas en las que las conclusiones obtenidas constituirán una base para la toma de decisiones en materia de salud. Tal es el caso de los experimentos mutagénicos, los cuales permiten evaluar el daño que ciertos compuestos podrían tener en los seres vivos a nivel genético.

Existe un gran número y variedad de pruebas biológicas que permiten evaluar el efecto de ciertos agentes en el ADN. Los ensayos de mutagénesis bacteriana, especialmente la prueba de Ames (ensayo de mutación reversa con *Salmonella typhimurium* his⁻), han sido utilizados alrededor del mundo en laboratorios de investigación y en agencias reguladoras gubernamentales por más de dos décadas.

De manera general la prueba tiene sustento teórico en el hecho de que la mayoría de los compuestos mutagénicos conocidos son cancerígenos. De tal modo que las mutaciones puntuales provocadas en los microorganismos utilizados para la prueba permitirán detectar compuestos potencialmente dañinos. Cabe destacar que las mutaciones puntuales son la causa de muchas enfermedades genéticas humanas y hay evidencia de que éstas en los oncogenes y los genes supresores de tumores en las células somáticas están involucradas en la formación de tumores en humanos y en animales experimentales.

El objetivo de la investigación es evaluar la existencia de interacciones estadísticas entre dos enzimas bacterianas purificadas (A (SnrA) y B (Cnr)) y entre las enzimas y los compuestos químicos seleccionados (1,3 Dinitropireno, 1,6 Dinitropireno y 1,8 Dinitropireno), para determinar cuál de las combinaciones de niveles de los factores producen una respuesta mutagénica más elevada y en consecuencia un daño mayor en el ADN.

De acuerdo con lo anterior, se calculó el tamaño de muestra necesario, se generó el diseño factorial asimétrico ($2^k \times 3^m$) en JMP y se realizaron las corridas aleatoriamente. Finalmente, los datos se analizaron con JMP, se evaluó el cumplimiento de los supuestos del modelo, se realizaron las transformaciones pertinentes y se procedió a elaborar las conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos se concluyó lo siguiente:

- La Enzima A presenta un efecto significativo en el modelo.
- No existe interacción estadística entre las enzimas A y B
- La interacción Enzima B*Compuesto es significativa.
- La combinación de 1,6 Dinitropireno con la Enzima B es la que reporta mayor daño
- El 1,3 Dinitropireno y el 1,8 Dinitropireno tienen una respuesta promedio muy similar en presencia de la Enzima B.
- La combinación que produce un número mayor de revertantes inducidos es la que corresponde al 1,6 Dinitropireno, cuando se agregan ambas Enzimas.
- La combinación que produce un número menor de revertantes inducidos es la que corresponde al 1,6 Dinitropireno en ausencia de Enzimas.

I.-INTRODUCCIÓN

1.1 Diseños Factoriales

1.1.1 Fundamentos de los Diseños Factoriales

De acuerdo con lo expuesto por Montgomery (2004), un experimento se define como una prueba o serie de pruebas en las que se hacen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema para observar e identificar las razones de los cambios que pudieran observarse en la variable de respuesta o de salida.

Las variables de entrada, factores o variables independientes son las características cuyo efecto queremos estudiar. Dichos factores pueden tener uno o más niveles, los cuales son la o las categorías estudiadas del factor. Así, las combinaciones de los factores y los niveles estudiados constituyen los tratamientos en el experimento.

Por diseño factorial se entiende que en cada ensayo o réplica completa del experimento se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores (Cochran y Cox 1965, Atkinson y Bailey 2001, Kuehl 2001, Montgomery 2004). De esta manera, el número total de tratamientos o condiciones experimentales depende del número de factores y el número de niveles en cada factor. Si N y L_i son el número de factores y el número de niveles en cada factor i , respectivamente, el número de condiciones experimentales (tratamientos) es igual a $L_1 \times L_2 \times \dots \times L_N$. Por esta razón, el experimento es generalmente referido como un experimento factorial (García-Díaz y Phillips 1995).

En este tipo de experimentos, a diferencia de los de un solo factor, se pueden evaluar las interacciones, es decir, se puede evaluar si los factores no producen el mismo efecto en la respuesta con niveles diferentes de otro factor (Montgomery 2004).

De acuerdo con Kuehl (2001), los experimentos factoriales permiten evaluar tres efectos sobre la variable de respuesta:

- a) Efecto Simple: Comparación entre los niveles de un factor a un solo nivel de otro factor.
- b) Efecto Principal: Comparación entre los niveles de un factor promediados para todos los niveles de otro factor. Son los efectos promedio de un factor.

- c) Efecto de Interacción: Son las diferencias entre los efectos simples. Miden las diferencias entre los efectos simples de un factor a diferentes niveles de otro factor.

1.1.2 Tipos de Diseños Factoriales

Existen un gran número de diseños factoriales. A continuación se definen brevemente algunos de los más comunes:

DISEÑO DE UN SOLO FACTOR: En este tipo de diseño se analiza un solo factor con varios niveles. El caso típico es el análisis de varianza de una sola vía (Montgomery 2004).

DISEÑO FACTORIAL 2^k : Este tipo de diseño se presenta cuando se tienen k factores, cada uno con dos niveles. Estos niveles pueden ser cuantitativos o cualitativos (p.ej. niveles "superior" e "inferior" de un factor, o quizás, la ausencia o presencia de un factor). Este tipo de diseño es particularmente útil en las primeras fases del trabajo experimental, cuando es probable que haya muchos factores por investigar (Montgomery 2004).

Una réplica completa de tal diseño requiere que se recopilen $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ observaciones y se conoce como diseño general 2^k . Debido a que sólo hay dos niveles para cada factor, debe suponerse que la respuesta es aproximadamente lineal en el intervalo de los niveles elegidos de los factores (Montgomery 2004).

DISEÑO FACTORIAL 3^k : Este es un diseño que consta de k factores con tres niveles cada uno. Los tres niveles de los factores pueden referirse como nivel bajo, medio y alto. Estos niveles se representan de acuerdo con lo siguiente:

-1 corresponde al nivel bajo

0 corresponde al nivel intermedio

+1 corresponde al nivel alto

Cada combinación de tratamientos de un diseño 3^k se representa mediante k dígitos, donde el primero indica el nivel de A, el segundo señala al nivel de B, y el k -ésimo dígito, el nivel del factor k . Por ejemplo, en un diseño 3^3 , la combinación 001 denota la presencia de los factores A y B en un nivel bajo y el factor C en un nivel alto (Montgomery 2004).

DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONARIOS 2^{k-p} Y 3^{k-p} : En un experimento factorial fraccionario, solamente se realiza una fracción de los tratamientos (Dean y Voss 1999). Una gran ventaja de este tipo de diseños es el ahorro en tiempo y en dinero, pero la desventaja radica en que los efectos principales e interacciones pueden estar confundidos, es decir, no pueden ser estimados en forma independiente. A los contrastes factoriales que están confundidos se les llama “alias” (Dean y Voss 1999).

Cuando el número de factores (k) de un diseño factorial 2^k se incrementa, el número de corridas necesarias para realizar una réplica completa del diseño rebasa con rapidez los recursos de la mayoría de los experimentadores (Montgomery 2004), por lo que conviene utilizar estos diseños factoriales fraccionados.

En este tipo de diseños se tienen 2^{k-p} tratamientos, de manera que si tenemos un diseño de tipo 2^3 y por motivos de tiempo o de recursos únicamente podemos realizar la mitad de los tratamientos que implica el diseño completo, decimos que se trata de un medio del diseño 2^3 , ya que $(2^3)(1/2) = 2^{3-1} = 2^2 = 4$ tratamientos. Entonces, un diseño 2^{k-1} implicará $1/2$ del diseño completo, un diseño 2^{k-2} implicaría $1/4$ del diseño completo, un diseño 2^{k-3} implicaría $1/8$ del diseño completo y así sucesivamente.

Siguiendo el mismo razonamiento, en el caso de un diseño 3^k , el factorial fraccionario correspondiente sería un diseño en el que se tienen 3^{k-p} tratamientos, de manera que si tenemos un diseño 3^4 en el que solamente podemos realizar 9 de los 81 tratamientos del diseño completo, decimos que se trata de un noveno del diseño 3^k , ya que $(3^4)(1/9) = 3^{4-2} = 3^2 = 9$ tratamientos. Entonces, un diseño 3^{k-1} implicará $1/3$ del diseño completo, un diseño 3^{k-2} implicaría $1/9$ del diseño completo, un diseño 3^{k-3} implicaría $1/27$ del diseño completo y así sucesivamente.

El diseño factorial fraccionario 2^{k-p} se usa en experimentos de escrutinio para identificar con rapidez y de manera eficiente el subconjunto de factores que son activos, y para obtener alguna información sobre algunas interacciones. Si el experimentador puede

suponer razonablemente que ciertas interacciones de orden superior son insignificantes, es posible obtener información de los efectos principales y las interacciones de orden inferior corriendo únicamente una fracción del experimento factorial completo (Montgomery 2004).

El diseño factorial fraccionario 3^{k-p} constituye un caso similar al 2^{k-p} , aunque cabe mencionar que a menudo se desea un fraccionamiento mayor del diseño 3^k , debido al número de tratamientos necesarios (Dean y Voss 1999).

FACTORIALES ASIMÉTRICOS: Para experimentos factoriales simétricos, el número de niveles de todos los factores son iguales (Atkinson y Bailey 2001). Para los experimentos factoriales asimétricos, los niveles de algunos factores pueden ser iguales, pero no todos los niveles de los factores son iguales (García Díaz y Phillips 1995, Ryan 2007). Un factorial asimétrico (completo) es de la forma general $a^{k_1} b^{k_2}$, con k_1 y k_2 mayores o iguales a 1 y $2 \leq a < b$ (Ryan 2007).

En los diseños antes mencionados se asume que:

- a) Los factores son fijos
- b) El diseño del experimento es completamente al azar
- c) Se satisfacen los supuestos usuales del análisis de varianza (Homsocedasticidad, normalidad e independencia).

1.1.3 La Importancia de los Diseños Factoriales en la Experimentación

La experimentación tiene un papel fundamental en todos los campos de la investigación y el desarrollo, siendo su objetivo principal la obtención de *información de calidad* que permita desarrollar nuevos productos y procesos, comprender mejor un sistema y tomar decisiones sobre cómo optimizarlo y mejorar su calidad, o bien comprobar hipótesis científicas (Ferré y Ruis 2004).

Usualmente los experimentos incluyen varios factores, por lo que el enfoque correcto para estudiar situaciones de este tipo es el uso de experimentos factoriales (Montgomery 2004).

Este tipo de diseños constituyen una estrategia experimental en la que los factores se hacen variar en conjunto, de manera que permiten la estimación de los efectos de un factor

con varios niveles de los factores restantes, produciendo conclusiones que son válidas para un rango de condiciones experimentales (Montgomery 2004). De esta manera, los diseños factoriales producen experimentos más eficientes, pues proporcionan información sobre todos los factores, y estiman el efecto de varias variables simultáneamente (Box *et al.* 2001 y Kuehl 2001). Asimismo, permiten identificar si los factores actúan en las unidades experimentales de manera independiente, o en caso contrario, si existe una interacción entre factores (Kuehl 2001, Cox y Reid 2000). La interacción entre factores solamente se puede evaluar en experimentos de este tipo, cuestión que no es posible al realizar series de experimentos evaluando un factor a la vez (Cox y Reid 2000).

De acuerdo con Cochran y Cox (1965) existen tres casos principales en los que la experimentación factorial es adecuada:

- a) En trabajos de exploración, donde el objeto es determinar rápidamente los efectos de cada uno de cierto número de factores dentro de un intervalo específico.
- b) En investigaciones de las interacciones entre los efectos de varios factores. Por su naturaleza las interacciones no se pueden estudiar sin probar algunas de las combinaciones de los diferentes factores. Frecuentemente la información se obtiene mejor probando todas las combinaciones.
- c) En experimentos diseñados para poder llegar a recomendaciones que deben aplicarse a una gran variedad de condiciones. Se pueden introducir factores auxiliares en un experimento para probar los factores principales bajo una variedad de condiciones similares a las encontradas en la población a la cual se van a aplicar dichas recomendaciones.

2.1 El Ensayo de Mutación Reversa con la Bacteria *Salmonella typhimurium*

2.1.1 Fundamentos de la Prueba

Los ensayos de mutagénesis bacteriana, especialmente la prueba de Ames (ensayo de mutación reversa con *Salmonella typhimurium* his⁻), han sido utilizados alrededor del

mundo en laboratorios de investigación y en agencias reguladoras gubernamentales por más de dos décadas (Nylund *et al.* 1992, Josephy *et al.* 1997).

De manera general la prueba tiene sustento teórico en el hecho de que la mayoría de los compuestos mutagénicos conocidos son cancerígenos. De tal modo que las mutaciones puntuales provocadas en los microorganismos utilizados para la prueba permitirán detectar compuestos potencialmente dañinos (O'Hare y Atterwill 1995, OECD 2003). Las mutaciones puntuales son la causa de muchas enfermedades genéticas humanas y hay evidencia de que éstas en los oncogenes y los genes supresores de tumores en las células somáticas están involucradas en la formación de tumores en humanos y en animales experimentales (OECD 2003).

El ensayo diseñado por Ames *et al.* (1973), tiene entre otras ventajas una especificidad alta, cerca del 90 % de los carcinógenos probados resultaron ser mutagénicos en la prueba (McCann y Ames 1976), bajo costo y obtención de resultados a corto plazo.

La prueba se basa en la reversión de un genotipo his^- (auxótrofas) a un genotipo his^+ (protótrofas) en varias cepas de *Salmonella typhimurium* incapaces de sintetizar el aminoácido esencial histidina debido a la mutación por corrimiento de marco de lectura, o bien la sustitución de pares de bases (Figura 1).

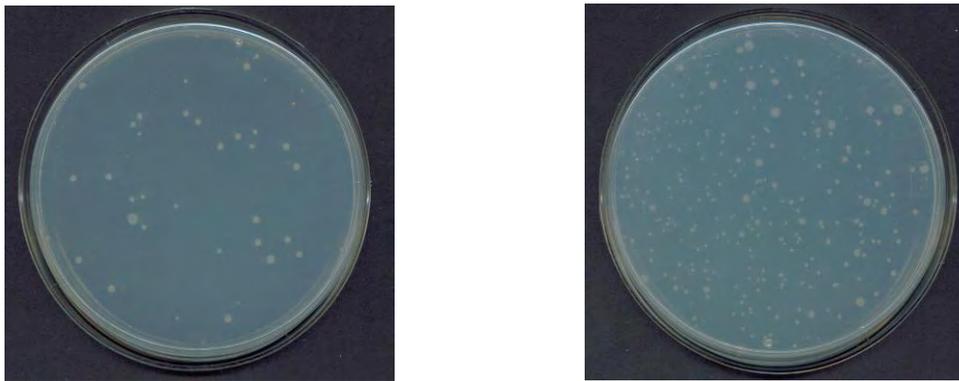


Figura 1. Colonias his^- de la cepa TA98 (izquierda) y Colonias his^+ de la cepa TA98 (derecha) como resultado de la aplicación de 50 ng del mutágeno directo 1-Nitropireno.

Las cepas tienen otras características que hacen a los microorganismos más sensibles a los mutágenos; por ejemplo: la mutación *rfa* que implica una pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos, que incrementa su permeabilidad a moléculas grandes, la delección del gen *uvrB*, que también incluye a los genes de la nitrato reductasa (*Chl*) y de la

biotina (*bio*) , que elimina el sistema de reparación por escisión en el ADN. Las cepas presentan factores R (plásmidos) que incrementan la reparación propensa a error en el ADN, además de que cuentan con genes de resistencia a antibióticos (Ames *et al.* 1975, Maron y Ames 1983)(Tabla I).

Tabla I. Genotipos de algunas cepas utilizadas en la prueba.

CEPA	GENOTIPO	EVENTO MUTACIONAL
TA98	hisD3052, <i>rfa</i> , $\Delta(uvrB, chl$ y <i>bio</i>), pKM101(Ap ^r)	Corrimiento de marco de lectura
TA100	hisG46, <i>rfa</i> , $\Delta(uvrB, chl$ y <i>bio</i>), pKM101(Ap ^r)	Substitución de pares de bases
YG1021	hisD3052, <i>rfa</i> , $\Delta(uvrB, chl$ y <i>bio</i>), pYG216 (Ap ^r y Tr ^r) Nitrorreductasa elevada	Corrimiento de marco de lectura
YG7132	hisD3052, <i>gal</i> , <i>rfa</i> , $\Delta(uvrB, chl$ y <i>bio</i>), pKM101(Ap ^r y Km ^r) Nitrorreductasa suprimida	Corrimiento de marco de lectura

Fuente: Ames *et al.* (1975), Einistö *et al.* (1991) y Yamada *et al.* (1997).

Las diferentes cepas presentan sensibilidad a distintos compuestos; la cepa TA98 es recomendada para pruebas generales de mutagenicidad (Maron y Ames 1983, Mortelmans y Zeiger 2000).

2.1.2 Enzimas y Mutágenos

Gran variedad de compuestos químicos requieren activación metabólica para ejercer su efecto mutagénico y cancerígeno (Kappers *et al.* 2000).

Existe evidencia de que los nitroarenos no reaccionan directamente con ADN purificado, sino que requieren ser transformados a metabolitos secundarios antes de provocar mutaciones. En la prueba de Ames, son transformados por las bacterias a metabolitos que forman aductos con el ADN (Rosenkranz y Mermelstein 1983, Kappers *et al.* 2000).

Los nitroarenos son activados por las enzimas bacterianas en dos pasos principales: el primero implica reducciones de las especies nitro a nitroso y de la reducción de nitroso a arilhidroxilamina y el segundo involucra la O-acetilación de las arilhidroxilaminas dando lugar a los N-acetoxiésteres o su reducción hasta formar arilaminas (Figura 2) (Josephy *et al.* 1997, Kappers *et al.* 2000, Haak *et al.* 2001). En ambos casos los metabolitos reaccionan con el ADN, aunque la habilidad de reducir estos grupos funcionales depende del tamaño del sistema aromático (Haak *et al.* 2001).

En *Salmonella typhimurium* se han descrito hasta la fecha dos nitrorreductasas denominadas SnrA y Cnr (Carroll *et al.* 2002) las cuáles utilizan NAD(P)H y/o NADH como fuente de equivalentes reductores (Tatsumi *et al.* 1982 y Paterson *et al.* 2002).

Es importante señalar que ciertos aspectos del mecanismo catabólico de las nitrorreductasas bacterianas y en especial de las de *S. typhimurium* son desconocidos aún. A la fecha no se han reportado evidencias claras sobre la especificidad de cada una de las enzimas, ni de la función fisiológica de éstas dentro de la célula.

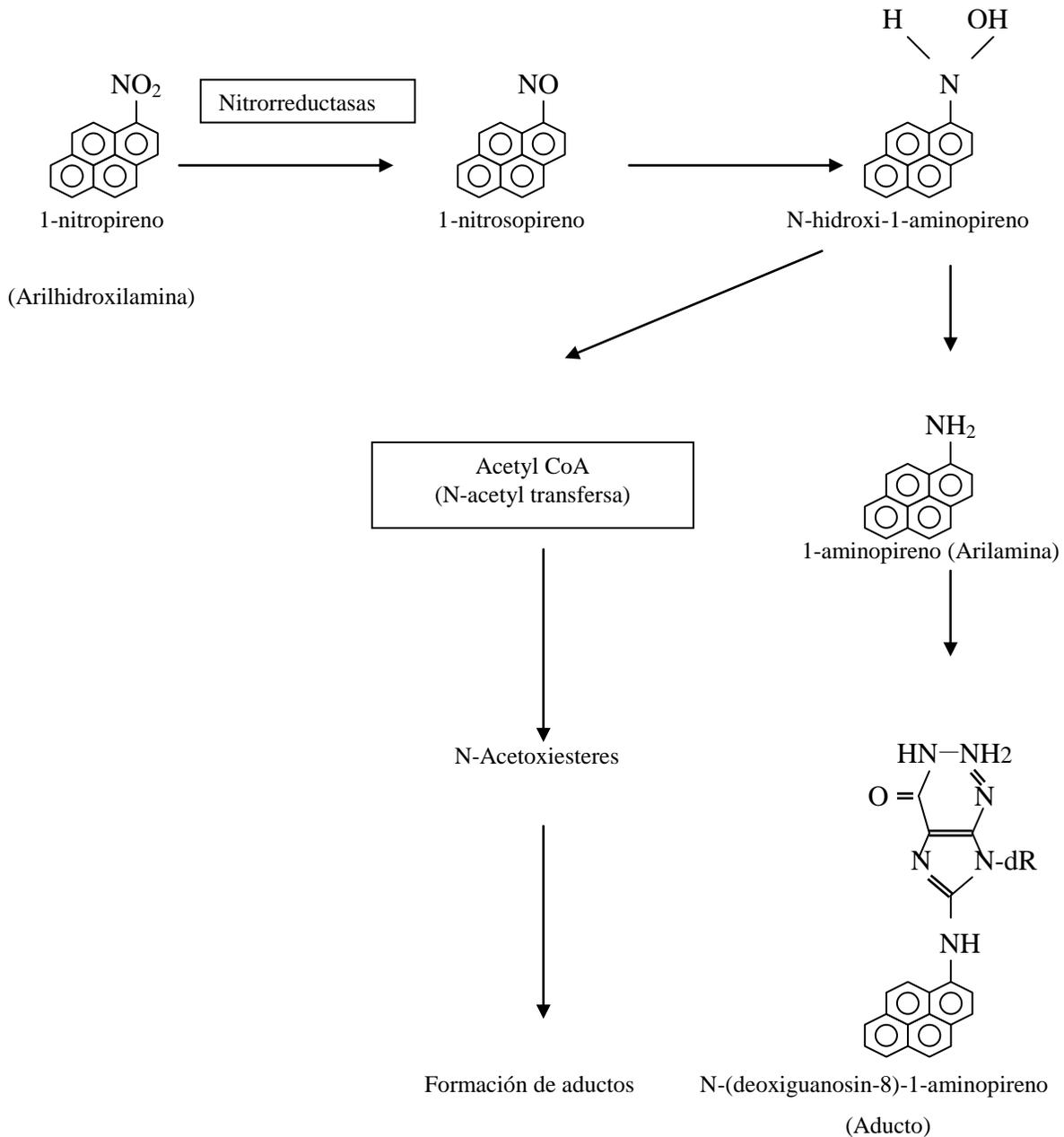


Figura 2. Metabolismo de los nitro-HAP por las enzimas bacterianas. Fuentes: Arimochi *et al.* (1997), Josephy *et al.* (1997) y Kielhorn *et al.* (2003).

II.-ANTECEDENTES

La versatilidad y bajo costo de la prueba de Ames han permitido el desarrollo de un gran número de modificaciones al ensayo original (Claxton *et al.* 1987, Mortelmans y Zeiger 2000). Algunas de ellas se basan en el incremento del número de células bacterianas, mediante técnicas de preincubación (Meshram y Rao 1988, Georghiou *et al.* 1989, Einistö *et al.* 1991, Goto *et al.* 1992, Tokiwa *et al.* 1992, Stamm *et al.* 1994), otras se basan en la reducción del volumen en la prueba (Alfheim *et al.* 1984, Bagley *et al.* 1992), en la automatización de la prueba (Arni *et al.* 1985, Arni y Müller 1988) o el uso de diversas fracciones enzimáticas (de origen animal, vegetal o bacteriano). En algunos casos se han combinado los elementos antes mencionados (Arimoto *et al.* 1981, Matsushita *et al.* 1992, Bagley *et al.* 1992, Cornet *et al.* 1992, Poth y Heidemann 1994, Filipic y Toman 1996, Lo *et al.* 2004).

Con base en lo anterior se hace evidente la necesidad de construir diseños experimentales complejos y acordes a cada investigación, ya que se incrementa el número de factores y de niveles en función de las modificaciones realizadas. Asimismo, es de vital importancia conocer el efecto de los diferentes factores y sus interacciones con la variable de respuesta, que en este caso es el número de colonias bacterianas revertantes inducidas. Así, con un diseño experimental adecuado se puede concluir sobre el efecto de uno o más compuestos, una o más enzimas, u otras condiciones experimentales, además de sus interacciones, sobre la variable de respuesta.

A pesar del gran número de estudios realizados con la prueba de Ames, son pocos los trabajos que incorporan el diseño experimental como parte de sus metodologías; y son aún menos los que utilizan diseños factoriales para tal fin. Cabe destacar que en una revisión bibliográfica realizada por Prvan y Street (2002) sobre el uso de diseños factoriales en diversas áreas, solamente se encontró un trabajo -de un total de 140 analizados- sobre la prueba de Ames.

Es de particular interés para el presente trabajo el estudio realizado por Salamanca-Pinzón *et al.* (2006), ya que busca determinar el papel de cada nitrorreductasa (SnrA y Cnr) en la activación mutagénica de seis nitrocompuestos, entre los que se encuentran compuestos de nuestro interés. En este estudio se utilizaron lisados bacterianos en un diseño completamente al azar de un sólo factor.

Cabe destacar que en el estudio de Salamanca-Pinzón *et al.* (2006) se indica que no ha sido bien clarificado el papel de cada enzima en la activación de los nitrocompuestos. A pesar de esto, se ha observado que la enzima Cnr está más involucrada en la activación de nitrocompuestos en mutágenos, mientras que la enzima SnrA, aunque capaz de activar casi todos ellos, lo hace en menor concentración, o produce sustratos con una menor potencia mutagénica que los producidos por Cnr.

De acuerdo con lo anterior surgen varias interrogantes con respecto a la posible interacción entre las enzimas, las enzimas y los compuestos y sobre la significancia, desde el punto de vista estadístico de los efectos de la enzima SnrA.

III.-OBJETIVOS

- Establecer si existe interacción estadística entre dos nitrorreductasas bacterianas purificadas: A (SnrA) y B (Cnr) utilizadas en el experimento.
- Establecer si existe interacción entre los compuestos utilizados y alguna de las enzimas.
- Establecer qué combinación de factores y niveles (compuestos y enzimas) provoca la respuesta mutagénica más alta.

IV.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño Experimental

4.1.1 Tipo de Estudio

De acuerdo con la clasificación propuesta por Méndez *et al.* (2006), éste es un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo, con base en lo siguiente:

Experimental: Debido a que las variables independientes se encuentran bajo control del investigador, el estudio puede clasificarse como experimento.

Prospectivo: La información relevante para el estudio se obtiene al momento de realizarlo y para los fines del mismo.

Longitudinal: Para cada combinación de factores y niveles existen testigos de referencia para determinar el estado de las cepas antes de aplicarles la variante del factor causal. Para determinar el estado de las mismas después de aplicar la variante se observa a simple vista el número de colonias revertantes inducidas por el tratamiento. Como todas las cepas provienen de la misma población, esto equivale a observar la evolución del fenómeno a estudiar en la misma unidad experimental a lo largo del tiempo. Debido a esto cumple con los supuestos necesarios para ser considerado longitudinal.

Comparativo: Se comparan varias condiciones experimentales dadas por las variantes y combinaciones de factores y niveles.

4.1.2 Factores de Confusión, Validez Interna y Externa

Sobre la validez interna: Los posibles factores de confusión que se cree podrían presentarse, de acuerdo con lo propuesto por Claxton *et al.* (1992), se detallan a continuación:

- a) Contaminación de las cepas al momento del cultivo y la inoculación.
- b) Diferencias entre las condiciones de incubación de las cepas.

- c) Contaminación del compuesto a probar.
- d) Sesgos de selección en la variante del factor causal (tratamiento).

Estos factores de confusión se controlaron trabajando en condiciones estériles (en campana de flujo laminar), aleatorizando la ubicación de las placas en la estufa de incubación y trabajando en una campana de extracción con el objetivo de evitar la contaminación cruzada de vapores o disolventes orgánicos.

Asimismo, para controlar dichos factores se recurrió a la aleatorización de los tratamientos, además de que se etiquetaron los compuestos con claves desconocidas por el investigador para reducir en la medida de lo posible los sesgos de evaluación.

Cabe mencionar que los factores de confusión mencionados en éste apartado corresponden a un concepto diferente al utilizado en los experimentos factoriales fraccionarios denominado “alias”, el cual hace referencia a los contrastes factoriales confundidos.

Sobre la validez externa: los resultados obtenidos son extrapolables a estudios realizados bajo condiciones similares.

4.1.3 Elección del Diseño: Niveles, Factores y Variable de Interés

La variable de interés es el número de colonias revertantes inducidas, la cual es una variable dependiente, cuya escala de medición es absoluta.

Bajo la óptica del diseño y análisis de experimentos se tiene un diseño factorial con tres factores: Compuesto, Enzima A y Enzima B con 3,2 y 2 niveles respectivamente, por lo que se trata de un diseño con niveles mixtos de acuerdo con la clasificación de Montgomery (2004)(Tabla II).

Tabla II. Niveles y factores utilizados en el experimento

Factor	Niveles		
Compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3
Enzima A	Con Enzima A	Sin Enzima A	
Enzima B	Con Enzima B	Sin Enzima B	

En los tres casos se trata de factores fijos, ya que son determinados por el investigador y no seleccionados aleatoriamente del conjunto posible de niveles existentes (si fuera así sería un modelo de efectos aleatorios o un modelo mixto). Los factores son categóricos y la respuesta es numérica (variable dependiente: “Número de colonias bacterianas revertantes inducidas”).

El total de tratamientos a aplicar se muestra en la Tabla III. Con base esto, se procederá a calcular el tamaño de muestra que permitirá establecer el número de repeticiones necesarias para realizar el experimento.

Tabla III. Tratamientos del experimento factorial 3x2x2

Tratamiento	Compuesto	Enzima	
1	Compuesto 1	Sin A	Sin B
2	Compuesto 1	Sin A	Con B
3	Compuesto 1	Con A	Sin B
4	Compuesto 1	Con A	Con B
5	Compuesto 2	Sin A	Sin B
6	Compuesto 2	Sin A	Con B
7	Compuesto 2	Con A	Sin B
8	Compuesto 2	Con A	Con B
9	Compuesto 3	Sin A	Sin B
10	Compuesto 3	Sin A	Con B
11	Compuesto 3	Con A	Sin B
12	Compuesto 3	Con A	Con B

4.1.4 Cálculo del Tamaño de Muestra y Aleatorización

El modelo para el experimento con diseño completamente al azar es:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{l(ijk)}$$

De acuerdo con lo expuesto por Lorenzen y Anderson (1993), se procede a calcular el tamaño de muestra adecuado para un experimento factorial 3x2x2, usando valores de $\alpha=0.05$ y $\beta=0.10$

- c) En las columnas marcadas con la “F” reemplazar los asteriscos por un cuadro negro, donde el término en la columna de la izquierda coincide con el del renglón superior. El procedimiento se muestra en la Tabla VI.

Tabla VI. Eliminación de coincidencias para los factores fijos cuyo índice en la columna coincide con el índice en el renglón.

Tipo de Efecto	F	F	F	F	F	F	F	R
Efecto	A _i	B _j	AB _{ij}	C _k	AC _{ik}	BC _{jk}	ABC _{ijk}	E _{i(jik)}
A _i			*		*		*	*
B _j			*			*	*	*
AB _{ij}							*	*
C _k					*	*	*	*
AC _{ik}							*	*
BC _{jk}							*	*
ABC _{ijk}								*
E _{i(jik)}								*

- d) En las columnas marcadas con una “M” revisar de arriba hacia abajo cada asterisco (*). Cualquier subíndice fijo del renglón superior no contenido en la columna de la izquierda indicará que el asterisco debe eliminarse. De otra manera, mantener el asterisco.

En este caso no se tienen columnas marcadas con “M”.

- e) Sobre cada término del renglón superior, colocar el entero resultante de la división del tamaño total del experimento entre todos los niveles de los subíndices contenidos en ese término. Estos son los coeficientes de columna.

Considerando que el tamaño total del experimento analizado es de 36 observaciones¹, se obtiene lo que se muestra en la Tabla VII.

¹ El número de observaciones corresponde a un experimento preliminar realizado en condiciones similares.

Tabla VII. Coeficientes de columna para cada factor

Número de Niveles	3	2	6	2	6	4	12	36
Coeficientes de Columna	12	18	6	18	6	9	3	1
Tipo de Efecto	F	F	F	F	F	F	F	R
Efecto	A _i	B _j	AB _{ij}	C _k	AC _{ik}	BC _{jk}	ABC _{ijk}	E _{l(ijk)}
A _i			*		*		*	*
B _j			*			*	*	*
AB _{ij}							*	*
C _k					*	*	*	*
AC _{ik}							*	*
BC _{jk}							*	*
ABC _{ijk}								*
E _{l(ijk)}								*

- f) Para escribir el EMS para cualquier término dado, leer el renglón correspondiente de derecha a izquierda utilizando los coeficientes de columna, reemplazando cualquier asterisco (*) con el efecto de σ^2 correspondiente y reemplazando cualquier cuadro negro con el efecto correspondiente de ϕ^* . Los resultados se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Esperanza de cuadrados medios para cada término

Efecto	EMS(X)
A _i	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 6\sigma^2_{AC} + 6\sigma^2_{AB} + 12\phi_A$
B _j	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 9\sigma^2_{BC} + 6\sigma^2_{AB} + 18\phi_B$
AB _{ij}	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 6\phi_{AB}$
C _k	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 9\sigma^2_{BC} + 6\sigma^2_{AC} + 18\phi_C$
AC _{ik}	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 6\phi_{AC}$
BC _{jk}	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 9\phi_{BC}$
ABC _{ijk}	$\sigma^2 + 3\phi_{ABC}$
E _{l(ijk)}	σ^2

Una vez que se tienen los EMS(X), se calcula su valor numérico utilizando como valores de σ^2 los cuadrados medios de un análisis realizado previamente para un experimento similar con 36 observaciones. Los resultados se observan en la Tabla IX.

* Es el parámetro que corresponde a la diferencia especificada entre las medias de dos tratamientos para un valor de α y β determinado (Montgomery 2004).

Tabla IX. Valores numéricos de los cuadrados medios esperados para cada término

VARIANZAS	VALOR DE LAS VARIANZAS	EMS(X)	VALOR EMS(X)
MS(A) = σ^2_A	68859.1	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 6\sigma^2_{AC} + 6\sigma^2_{AB} + 12\phi_A$	7356.109
MS(B) = σ^2_B	8587.11	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 9\sigma^2_{BC} + 6\sigma^2_{AB} + 18\phi_B$	3506.669
MS(AB) = σ^2_{AB}	76.77	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 6\phi_{AB}$	1181.869
MS(C) = σ^2_C	13533.4	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 9\sigma^2_{BC} + 6\sigma^2_{AC} + 18\phi_C$	9216.289
MS(AC) = σ^2_{AC}	1023.44	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 6\phi_{AC}$	738.049
MS(BC) = σ^2_{BC}	256	$\sigma^2 + 3\sigma^2_{ABC} + 9\phi_{BC}$	746.449
MS(ABC) = σ^2_{ABC}	165.333	$\sigma^2 + 3\phi_{ABC}$	233.65
MS(E) = σ^2	225.25	σ^2	225.25

Cabe mencionar que $\phi=2.8$, y es una constante utilizada por Lorenzen y Anderson (1993) para valores de $\alpha=0.05$ y $\beta=0.10$.

2.-Se calcula la diferencia detectable mínima ($\delta(x)$) para cada caso y Δ (indica qué tan pequeñas son las diferencias susceptibles de ser detectadas con el diseño propuesto). Lo anterior se efectúa con las siguientes expresiones:

$$\delta(x) = \phi \sqrt{((D+1)EMS(X)/(DxC))}$$

$$\Delta = \delta(x) / \sqrt{EMS(X)}$$

Donde:

$$\phi = 2.8$$

D = Grados de libertad del factor o de la interacción de interés

C = M / L = Número de veces que cada nivel es repetido.

M = Número Total de observaciones en el experimento (en este caso fueron 36)

L = Niveles del Factor o de la Interacción de interés

Los resultados se observan en la Tabla X.

Tabla X. Valores numéricos de $\delta(X)$ y Δ para cada término.

C	Factor o Interacción	$\delta(X)$	Δ
12	A_i	72.1560149	0.8412953
18	B_j	40.152234	0.67805095
6	AB_{ij}	42.4463618	1.23468395
18	C_k	65.0939115	0.67805095
6	AC_{ijk}	33.5427294	1.23468395
9	BC_{jk}	26.8791538	0.98381972
3	ABC_{ijk}	28.5331464	1.86666667
36	E_{l(ijk)}	9.90499313	0.65996633

3.-Se calcula el tamaño del experimento (M(X)) para cada caso con la expresión:

$M(X) = \phi^2 L(D+1)MS(X)/(\delta^2 D)$. Los resultados se muestran en la Tabla XI.

Tabla XI. Cálculo del tamaño del experimento para evaluar cada uno de los efectos.

Efectos	Niveles del Factor o interacción (L)	M(X)
A_i	3	336.988971
B_j	2	88.1565839
AB_{ij}	6	2.33843176
C_k	2	52.863186
AC_{ik}	6	49.9205879
BC_{jk}	4	12.3464564
ABC_{ijk}	12	25.4739482
E_{l(ijk)}	36	36

Como nos interesa evaluar las interacciones, el tamaño del experimento, es decir, el número total de observaciones mínimo debe ser aproximadamente 49. Como el diseño básico contiene 12 tratamientos, entonces sería necesario replicarlo como mínimo 5 veces para tener $12 \times 5 = 60$. En virtud de que existe el riesgo de perder observaciones debido a que se está trabajando con material biológico susceptible de contaminarse, se procederá a replicarlo 6 veces para tener $12 \times 6 = 72$ observaciones.

Se considera que para los efectos con valores de Δ entre 0.93 y 1.14, el experimento es capaz de detectar diferencias pequeñas entre los niveles del factor, de acuerdo con lo propuesto por Lorenzen y Anderson (1993). Tal es el caso de la interacción doble BC (Ver Tabla X).

Entonces tendremos un factorial $3 \times 2 \times 2$ con 6 repeticiones en diseño completamente al azar. Es un diseño balanceado y completo, ya que se tiene el mismo número de réplicas para todos los tratamientos y se evalúan todos los tratamientos.

Una vez que se tiene el tamaño de muestra se procede a generar el diseño (factorial completo) del experimento en JMP 6.0, especificando que el orden de las corridas debe ser aleatorio (Ver ANEXO I).

4.2 El Ensayo de Mutación Reversa con la Bacteria *Salmonella typhimurium*

Se inoculó una solución (30 mL) de medio nutritivo Oxoid No.2 (ampicilina y kanamycina 25 µg / mL) con una asada de reserva en placa de la cepa YG7132² y se incubo por agitación (150 rpm) a 37 °C durante 16 h en la obscuridad.

Una vez concluida la incubación, en condiciones estériles, se adicionaron en un tubo con 2.0 mL de agar de superficie (histidina / biotina 0.5 mM) fundido y a 45°C, los siguientes elementos según corresponda:

- 1.- 100 µL del cultivo bacteriano + 50 µL del Compuesto + 10 µL de NADPH + 210 µL de Buffer³
- 2.- 100 µL del cultivo bacteriano + 50 µL del Compuesto + 10 µL de NADPH + 100 µL de la Enzima A + 110 µL de Buffer
- 3.- 100 µL del cultivo bacteriano + 50 µL del Compuesto + 10 µL de NADPH + 100 µL de la Enzima B + 110 µL de Buffer
- 4.- 100 µL del cultivo bacteriano + 50 µL del Compuesto + 10 µL de NADPH + 100 µL de la Enzima A + 100 µL de la Enzima B + 10 µL de Buffer.

Posteriormente la mezcla se agitó en un vortex y se virtió en una placa con agar medio mínimo.

En primer lugar se hicieron las corridas para los controles (Ver ANEXO II) utilizando 1-Nitriopireno (0.8 nmoles/placa) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) para los tratamientos del control positivo. Se usó el 1-Nitriopireno debido a que es un mutágeno de efecto conocido que es activado por las enzimas utilizadas (SnrA y Cnr). Como control negativo se utilizó DMSO, que es un compuesto orgánico inocuo utilizado como disolvente para los compuestos en la prueba.

² Se utilizó ésta cepa, ya que una de sus características es tener las nitrorreductas suprimidas, de manera que podremos evaluar los efectos de las nitrorreductas puras A (SnrA) y B (Cnr) al agregarlas como parte de los tratamientos.

³ Es TRIS-HCL DTT estéril

En segundo lugar se realizaron las corridas que corresponden propiamente al experimento factorial. Las corridas se realizaron aleatoriamente con base en el diseño generado en JMP de acuerdo con lo señalado en la sección 4.1.4. (Ver ANEXO I).

Todas las placas se incubaron a 37 °C por 48 h y posteriormente las colonias revertantes inducidas se cuantificaron con un contador manual (Figura 3).

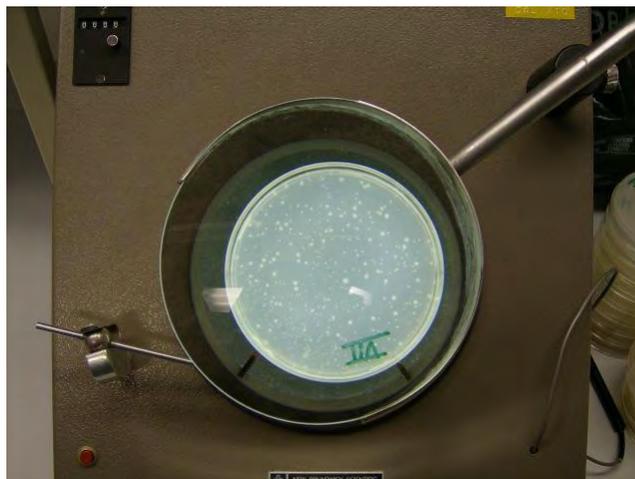


Figura 3. Contador manual de colonias bacterianas

Cabe mencionar que los compuestos fueron etiquetados con una clave por una tercera persona, de manera que la identidad de los compuestos fue conocida hasta que finalizó el conteo. Los compuestos y enzimas evaluados se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII. Compuestos y enzimas evaluados en el experimento

Compuesto 1	1,3 Dinitropireno 0.000171 nmoles/placa
Compuesto 2	1,8 Dinitropireno 0.000171 nmoles/placa
Compuesto 3	1,6 Dinitropireno 0.000684 nmoles/placa
Enzima A	Enzima SnrA 0.3 µg de proteína / placa
Enzima B	Enzima Cnr 0.3 µg de proteína / placa

Se eligió trabajar con estos compuestos y en estas dosis, debido a que se contaba con resultados preliminares que indicaban un efecto similar entre los tres a las dosis indicadas, además de ser bien conocido el hecho de que son metabolizados y activados por las enzimas utilizadas.

Las dosis de 1-Nitropireno y de los compuestos que se presentan en la Tabla XII fueron preparadas a partir de los reactivos puros marca Sigma, utilizando como disolvente DMSO puro.

Las enzimas son nitrorreductasas bacterianas purificadas de *Salmonella typhimurium* y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3 Procedimiento de Análisis Estadístico

a) Los datos contenidos en el ANEXO I fueron analizados utilizando JMP 6.0 con la secuencia Analyze>Fit Model> marcando el análisis de los factores principales, las interacciones dobles y la interacción triple utilizando como variable dependiente el número de colonias revertantes inducidas, que es nuestra variable de interés. El modelo se analizó utilizando las opciones:

Personality: Standard Least Squares

Emphasis: Effect Leverage

Asimismo, se probaron los supuestos correspondientes y se evaluó la pertinencia de realizar transformaciones para estabilizar la varianza (Ver ANEXO III).

b) Para analizar los datos con transformación logarítmica, únicamente se aplicó el logaritmo natural (Ln) a los resultados contenidos en el ANEXO I y se analizaron de acuerdo con lo expuesto en el inciso a.

c) Para obtener la transformación de Box-Cox (Ver APÉNDICE 2), se utilizaron los datos del ANEXO I y se usó la secuencia Analyze>Fit Model> marcando el análisis de los factores principales, las interacciones dobles y la interacción triple utilizando como variable dependiente el número de colonias revertantes inducidas, que es nuestra variable de interés. El modelo se analizó utilizando las opciones:

Personality: Standard Least Squares

Emphasis: Effect Screening

Con respecto a esta transformación, también se analizaron los datos utilizando el programa DOE++[®] (Relia Soft), debido a que permite realizar un análisis más detallado.

Una vez que se obtiene la transformación óptima para estabilizar la varianza, los datos se vuelven a analizar, con la variable de respuesta transformada, de acuerdo a lo señalado en el inciso a.

d) Para analizar los datos con transformación de raíz cuadrada (Transformación recomendada)(Ver ANEXO V), únicamente se obtuvo la raíz cuadrada de los resultados contenidos en el ANEXO I y se analizaron de acuerdo con el inciso a.

V.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en el experimento se contrastaron 7 hipótesis diferentes de acuerdo con el modelo lineal para el diseño experimental (Ecuación 1).

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{l(ijk)} \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

- Con $i = 1, 2, 3$ (Compuestos)
- Con $j = 1, 2$ (Enzima A)
- Con $k = 1, 2$ (Enzima B)
- Con $l = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ (repeticiones)

Donde:

Y_{ijkl} = número de colonias revertantes inducidas en la placa con compuesto i , nivel j de enzima A, nivel k de enzima B y la repetición l .

μ = media general

τ_i = efecto del compuesto i

β_j = efecto del nivel j de enzima A

γ_k = efecto del nivel k de enzima B

$(\tau\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción del compuesto con la enzima A

$(\tau\gamma)_{ik}$ = efecto de la interacción del compuesto con la enzima B

$(\beta\gamma)_{jk}$ = efecto de la interacción de la enzima A con la enzima B

$(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ = efecto de la interacción del compuesto con la enzima A y con la enzima B

$\varepsilon_{l(ijk)}$ = error aleatorio del compuesto i , enzima j , enzima k y de la repetición l .
Suponemos que $\varepsilon_{l(ijk)} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

Las hipótesis a probar para el diseño son las siguientes:

A. $H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = 0$ (Los efectos de todos los compuestos son iguales entre sí, e iguales a cero)

H_a : Al menos una $\tau_i \neq 0$ (Al menos el efecto de uno de los compuestos es diferente de cero)

B. $H_0 : \beta_1 = \beta_2 = 0$ (Los efectos de los niveles de la enzima A son iguales entre sí, e iguales a cero)

H_a : Al menos una $\beta_i \neq 0$ (Al menos el efecto de uno de los niveles de la enzima A es diferente de cero)

C. $H_0 : \gamma_1 = \gamma_2 = 0$ (Los efectos de los niveles de la enzima B son iguales entre sí, e iguales a cero)

H_a : Al menos una $\gamma_i \neq 0$ (Al menos el efecto de uno de los niveles de la enzima B es diferente de cero)

D. $H_0 : (\tau\beta)_{ij} = 0$ para todas las i, j (No existe interacción para ningún compuesto con ningún nivel de la enzima A)

H_a : Al menos una $(\tau\beta)_{ij} \neq 0$ (Al menos existe interacción entre un compuesto y uno de los niveles de la enzima A)

E. $H_0 : (\tau\gamma)_{ik} = 0$ para todas las i, k (No existe interacción para ningún compuesto con ningún nivel de la enzima B)

H_a : Al menos una $(\tau\gamma)_{ik} \neq 0$ (Al menos existe interacción entre un compuesto y uno de los niveles de la enzima B)

F. $H_0 : (\beta\gamma)_{jk} = 0$ para todas las j, k (No existe interacción para ningún nivel de la enzima A con ningún nivel de la enzima B)

H_a : Al menos una $(\beta\gamma)_{jk} \neq 0$ (Al menos existe interacción entre un nivel de la enzima A con un nivel de la enzima B)

G. $H_0 : (\tau\beta\gamma)_{ijk} = 0$ para todas las i, j, k (No existe interacción de ningún compuesto con ningún nivel de la enzima A y ningún nivel de la enzima B)

H_a : Al menos una $(\tau\beta\gamma)_{ijk} \neq 0$ (Al menos existe interacción entre uno de los compuestos con uno de los niveles de la enzima A y con uno de los niveles de la enzima B).

Antes de realizar el análisis estadístico del experimento se evaluaron los resultados de los controles correspondientes (Ver ANEXO II). Los valores obtenidos se compararon con los reportados en la literatura y los obtenidos en experimentos previos bajo las mismas condiciones. Como los resultados se encontraban dentro de los rangos establecidos en la

literatura y los observados en experimentos previos, entonces, se procedió a analizar el experimento factorial.

Al analizar los resultados del experimento factorial en JMP se observó que se violaba el supuesto de normalidad en la distribución de los residuales y el supuesto de independencia, como se aprecia en el ANEXO III y en la Tabla XIII, por lo que se decidió hacer una transformación logarítmica (Ln) -que es la transformación usual cuando la variable de respuesta es un conteo- a la variable de respuesta y repetir el análisis de los datos.

En virtud de que se corrigió la violación al supuesto de independencia, pero no se cumplía el de homogeneidad de varianzas, como se evidencia en el ANEXO IV y en la Tabla XIII, se optó por aplicar la transformación de Box-Cox para estabilizar las varianzas (ver ANEXO V).

Tabla XIII. Valores de “p” para cada prueba y condición analizada

Supuesto	Prueba	Variable de Respuesta			
		Sin transformación	Transformada con Ln	Transformación de Box-Cox	Transformación Raíz Cuadrada
Independencia	Durbin-Watson	0.0142	0.0999	0.022	0.0276
Normalidad	Shapiro-Wilk	0.0158	0.0068	0.1118	0.1241
Homoscedasticidad	Levene	0.099	0.032	0.137	0.123

Casos en los que se viola el supuesto

Como efectivamente se estabilizaron las varianzas, pero la interpretación resultaba muy complicada desde la perspectiva biológica, se optó por transformar la variable de respuesta aplicando una raíz cuadrada (Ver ANEXO V) a los resultados y se analizó el modelo. Con base en el modelo resultante se construyeron las conclusiones. Dicho análisis se presenta a continuación.

5.1 Análisis del Experimento con la Variable de Respuesta Transformada con Raíz Cuadrada

Como se aprecia en la Tabla XIV la “R cuadrada ajustada” Indica que el 86.46 % de la variación de los datos es explicada por el modelo, por lo cual se puede decir que el modelo es “adecuado” para describir los datos. Se interpreta la “R cuadrada ajustada”, ya que considera el número de variables independientes que se tienen en el modelo.

Tabla XIV. Resumen de ajuste del modelo

Summary of Fit	
RSquare	0.885589
RSquare Adj	0.864614
Root Mean Square Error	1.012872
Mean of Response	11.4475
Observations (or Sum Wgts)	72

La Tabla XV, en la que se muestra la tabla de análisis de varianza, es un resumen para probar el modelo en forma global, y en realidad lo que se debe interpretar es la Tabla XVI, en la que se realizan las pruebas correspondientes a los efectos.

Tabla XV. Análisis de varianza del modelo

Analysis of Variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	11	476.45915	43.3145	42.2205
Error	60	61.55460	1.0259	Prob > F
C. Total	71	538.01375		<.0001*

Como se aprecia en la Tabla XVI, no se rechaza H_0 para las hipótesis **F** y **G** (interacciones), ya que $p > 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- No existe interacción para ningún nivel de la enzima A con ningún nivel de la enzima B.
- No existe interacción para ningún compuesto con ningún nivel de las enzimas A y B.

Se rechaza H_0 para la hipótesis **E** (interacción), ya que $p < 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- Existe interacción para alguno de los compuestos con uno de los niveles de la enzima B

No se rechaza H_0 para la hipótesis **D** (interacción), ya que $p > 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- No existe interacción para alguno de los compuestos con uno de los niveles de la enzima A

Se rechaza H_0 para la hipótesis **B**, ya que $p < 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- El efecto de uno de los niveles de la enzima A es diferente de cero.

Tabla XVI. Pruebas para los efectos de los factores e interacciones

Effect Tests					
Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Compuesto	2	2	319.92048	155.9203	<.0001*
Enzima A	1	1	56.56934	55.1406	<.0001*
Enzima B	1	1	76.79736	74.8578	<.0001*
Compuesto*Enzima A	2	2	0.23735	0.1157	0.8910
Compuesto*Enzima B	2	2	17.84860	8.6989	0.0005*
Enzima A*Enzima B	1	1	0.43556	0.4246	0.5172
Compuesto*Enzima A*Enzima B	2	2	4.65047	2.2665	0.1125

De acuerdo con lo anterior, y en virtud de que no se deben evaluar efectos principales en presencia de interacciones que los contengan, se realizaron las pruebas correspondientes para analizar el efecto de la Enzima A y la interacción del Compuesto con la Enzima B, ya que en ambos casos se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

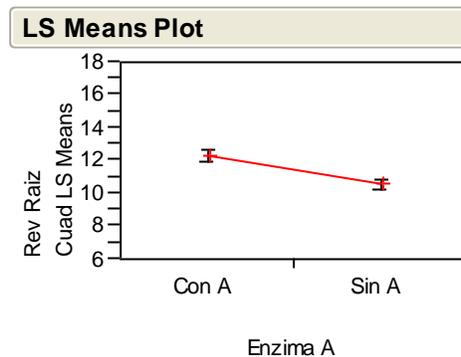
EFEECTO DE LA ENZIMA A: En la tabla XVII se aprecia que existen diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta promedio con y sin la enzima A, lo cual implica que el nivel de este factor tiene un efecto significativo en las colonias revertantes observadas. Asimismo, en la Figura 4 se aprecia que en presencia de la enzima A, el promedio de colonias revertantes es mayor que en ausencia de la misma.

Tabla XVII. Prueba t de Student para las medias de la respuesta con los dos niveles de la Enzima A

LSMeans Differences Student's t		
$\alpha = 0.050$ $t = 2.0003$		
	LSMean[j]	
Mean[i]-Mean[j]	Con A	Sin A
Std Err Dif		
Lower CL Dif		
Upper CL Dif		
LSMean[i]	Con A	0 1.77278 0 0.23874 0 1.29523 0 2.25032
	Sin A	-1.7728 0 0.23874 0 -2.2503 0 -1.2952 0
	Level	Least Sq Mean
	Con A A	12.333889
Sin A B	10.561111	

Levels not connected by same letter are significantly different.

Figura 4. Gráfico de respuestas promedio con y sin la Enzima A



INTERACCIÓN COMPUESTO*ENZIMA B: En vista de que solamente una interacción es estadísticamente significativa, se procedió a hacer el análisis correspondiente.

En la Tabla XVIII se aprecia que las respuestas medias forman 4 grupos homogéneos. Cabe destacar que el mayor número de colonias revertantes inducidas se obtiene al aplicar el compuesto 3 con la enzima B. Asimismo, se observa que con la enzima B los compuestos 1 y 2 se comportan de manera casi idéntica (Tabla XVIII y Figura 5). En ausencia de la enzima B los compuestos producen un daño progresivo en el siguiente orden

1, 2 , 3. Es de particular interés el hecho de que el compuesto 2 con y sin la enzima B pertenezcan a un grupo homogéneo junto con el compuesto 1 con la enzima B. Esto podría implicar que, al menos, con el compuesto 2, la enzima B no tiene un efecto estadísticamente significativo en el número de colonias revertantes inducidas obtenidas.

En el análisis de rebanadas (“Slices”)(Tabla XIX) se aprecia que para los compuestos 1 y 3 existen diferencias estadísticamente significativas, es decir, al mantener constante el compuesto hay efecto de la enzima B. En el caso del compuesto 2 se aprecia que no existe diferencia significativa en el promedio de colonias revertantes en presencia o ausencia de la Enzima B.

Asimismo, en la Tabla XIX, se observa que al analizar los casos en los que se tiene la Enzima B y en los que no se tiene (“Con B” y “Sin B” respectivamente), cada uno de los tres compuestos tiene un efecto medio diferente. Esta aseveración se hace evidente al observar las Figuras 5 y 6.

De acuerdo con lo antes expuesto, aparentemente los niveles del factor compuesto son la causa principal de las diferencias estadísticamente significativas observadas en las respuestas medias de los diferentes tratamientos.

Tabla XVIII. Prueba de Tukey para medias de compuesto y enzima B

LSMeans Differences Tukey HSD						
α= 0.050 Q= 2.9438						
LSMean[j]						
Mean[i]-Mean[j]	Compuesto 1,Con B	Compuesto 1,Sin B	Compuesto 2,Con B	Compuesto 2,Sin B	Compuesto 3,Con B	Compuesto 3,Sin B
Std Err Dif	0	0	0	0	0	0
Lower CL Dif	0	0	0	0	0	0
Upper CL Dif	0	0	0	0	0	0
Compuesto 1,Con B	0	2.81583	-0.1675	0.49083	-4.9158	-2.1933
	0	0.4135	0.4135	0.4135	0.4135	0.4135
	0	1.59856	-1.3848	-0.7264	-6.1331	-3.4106
	0	4.03311	1.04977	1.70811	-3.6986	-0.9761
Compuesto 1,Sin B	-2.8158	0	-2.9833	-2.325	-7.7317	-5.0092
	0.4135	0	0.4135	0.4135	0.4135	0.4135
	-4.0331	0	-4.2006	-3.5423	-8.9489	-6.2264
	-1.5986	0	-1.7661	-1.1077	-6.5144	-3.7919
Compuesto 2,Con B	0.1675	2.98333	0	0.65833	-4.7483	-2.0258
	0.4135	0.4135	0	0.4135	0.4135	0.4135
	-1.0498	1.76606	0	-0.5589	-5.9656	-3.2431
	1.38477	4.20061	0	1.87561	-3.5311	-0.8086
Compuesto 2,Sin B	-0.4908	2.325	-0.6583	0	-5.4067	-2.6842
	0.4135	0.4135	0.4135	0	0.4135	0.4135
	-1.7081	1.10773	-1.8756	0	-6.6239	-3.9014
	0.72644	3.54227	0.55894	0	-4.1894	-1.4669
Compuesto 3,Con B	4.91583	7.73167	4.74833	5.40667	0	2.7225
	0.4135	0.4135	0.4135	0.4135	0	0.4135
	3.69856	6.51439	3.53106	4.18939	0	1.50523
	6.13311	8.94894	5.96561	6.62394	0	3.93977
Compuesto 3,Sin B	2.19333	5.00917	2.02583	2.68417	-2.7225	0
	0.4135	0.4135	0.4135	0.4135	0.4135	0
	0.97606	3.79189	0.80856	1.46689	-3.9398	0
	3.41061	6.22644	3.24311	3.90144	-1.5052	0

Level	Least Sq Mean
Compuesto 3,Con B A	15.701667
Compuesto 3,Sin B B	12.979167
Compuesto 2,Con B C	10.953333
Compuesto 1,Con B C	10.785833
Compuesto 2,Sin B C	10.295000
Compuesto 1,Sin B D	7.970000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Figura 5. Gráfico de respuestas promedio con y sin la enzima B

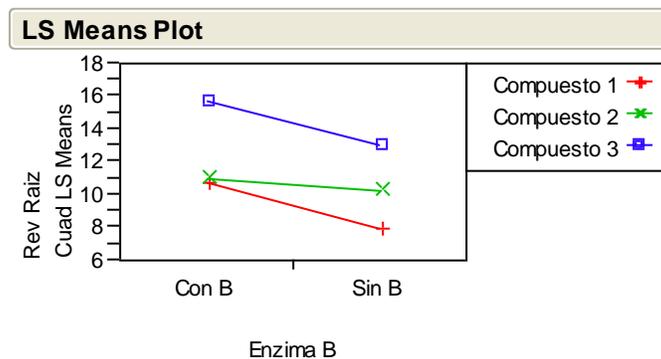
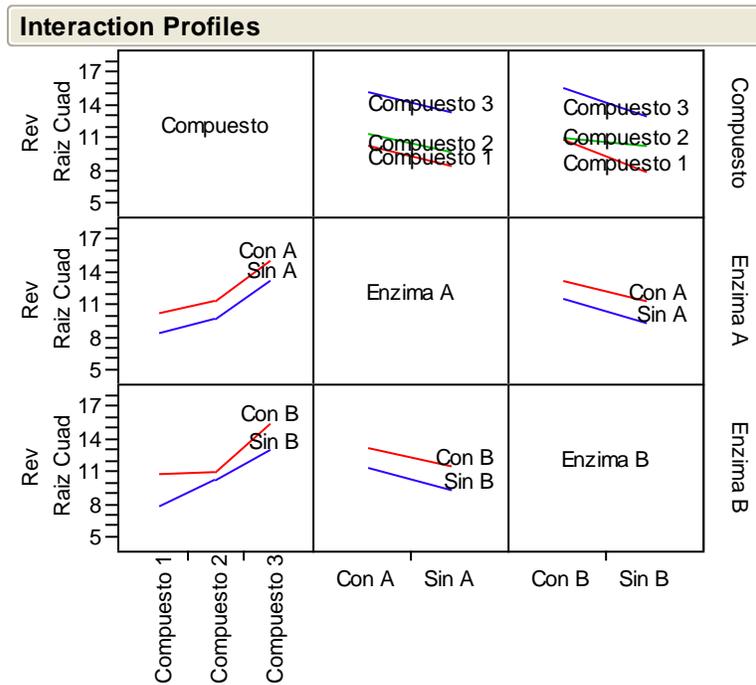


Tabla XIX. Prueba de significancia de un factor manteniendo constante el nivel del otro factor (“slices”)

Slice Compuesto=Compuesto 1		Slice Compuesto=Compuesto 2		Slice Compuesto=Compuesto 3	
Sum of Squares	47.573504167	Sum of Squares	2.6004166667	Sum of Squares	44.4720375
Numerator DF	1	Numerator DF	1	Numerator DF	1
Denominator DF	60	Denominator DF	60	Denominator DF	60
F Ratio	46.372005504	F Ratio	2.534741514	F Ratio	43.348868322
Prob > F	5.2772896e-9	Prob > F	0.1166204205	Prob > F	1.2760367e-8

Slice Enzima B=Con B		Slice Enzima B=Sin B	
Sum of Squares	186.96057222	Sum of Squares	150.80850556
Numerator DF	2	Numerator DF	2
Denominator DF	60	Denominator DF	60
F Ratio	91.1193829	F Ratio	73.499871117
Prob > F	6.564901e-19	Prob > F	7.335731e-17

Figura 6. Perfiles de interacción para el experimento



5.1.1 Verificación de los Supuestos

Para que cualquier análisis estadístico tenga validez es necesario revisar el cumplimiento de los supuestos, es decir, se verifica la adecuación del modelo. Los supuestos para el diseño factorial en cuestión son los siguientes:

INDEPENDENCIA: Este supuesto implica que el diseño se aplicó en forma adecuada, es decir, se asignaron los tratamientos en forma aleatoria a las unidades experimentales, efectuándose la aleatorización mediante un método objetivo.

En este caso se generó el diseño en JMP y se obtuvieron las corridas aleatorizadas antes de realizar el experimento (Ver ANEXO I). Con base en esto se efectuaron las corridas, de manera que el supuesto se cumple.

Como se busca definir si existe correlación o “patrones” entre los residuales del modelo, se aplica la prueba de Durbin-Watson (Ver APÉNDICE 1) bajo las siguientes hipótesis:

H₀: No hay correlación entre residuales
H₁: Hay autocorrelación de primer orden

En la Tabla XX se observa que $p < 0.05$, por lo tanto se rechaza H₀ y se concluye que existe autocorrelación entre los residuales.

Tabla XX. Cálculo del estadístico de Durbin-Watson

Durbin-Watson			
Durbin-Watson	Number of Obs.	AutoCorrelation	Prob<DW
1.534643	72	0.1720	0.0276*

Cabe mencionar que, si bien es cierto que existe autocorrelación de acuerdo con la prueba aplicada, ésta es moderada, ya que el valor del estadístico se aproxima a 2 y el valor de “p” no es muy lejano a 0.05.

Por otra parte, cabe mencionar que la aleatorización de las corridas aplicada durante el experimento en cuestión, permite la neutralización de las dependencias espaciales y temporales a escala de la unidad experimental, pero no a mayor o menor escala, de acuerdo con lo expuesto por Schabenberger y Pierce (2002).

NORMALIDAD: Este supuesto implica que los residuales se distribuyen normalmente.

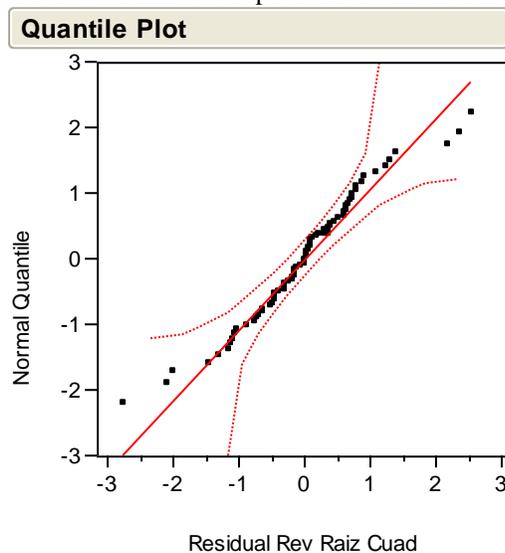
Los residuales se definen como:

$$e_{ijk} = Y_{ijkl} - Y_{ijkl}(\text{estimado})$$

Para obtener los residuales, como lo indica la fórmula, se restan los valores observados a los valores estimados por el modelo.

Al graficarlos, en la Figura 6 se observa que aparentemente se distribuyen normalmente. El gráfico no difiere considerablemente del obtenido con la transformación logarítmica (Ln) (Ver ANEXO IV), aunque cabe destacar que mejora en ambas colas.

Figura 6. Gráfico normal de cuantiles para la distribución de los residuales



Para corroborar lo anterior se realizaron las pruebas correspondientes bajo las siguientes hipótesis:

H_0 : Los datos provienen de una distribución normal

H_a : Los datos no provienen de una distribución normal

Como se observa en la Tabla XXI, el valor de “p” aumenta, comparado con el calculado considerando la variable de respuesta sin transformar, de tal manera que podemos concluir que la transformación con raíz cuadrada tiene como consecuencia una aproximación a la distribución normal. Como $p > 0.05$, no se rechaza H_0 y se concluye que la distribución de los residuales puede provenir de una normal.

Tabla XXI. Prueba Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los residuales del modelo obtenido

Goodness-of-Fit Test	
Shapiro-Wilk W Test	
W	Prob<W
0.973020	0.1241
Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.	

HOMOSCEDASTICIDAD: Este supuesto implica la igualdad de varianzas entre las colonias revertantes inducidas agrupadas por tratamiento.

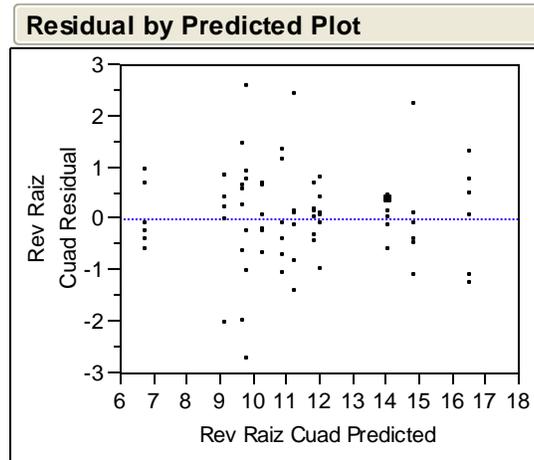
Como se observa en la Tabla XXII $p > 0.05$, por lo tanto no se rechaza H_0 y se concluye que hay homogeneidad de varianzas.

Tabla XXII. Prueba de Levene para probar la homogeneidad de varianzas en la variable de respuesta

Test of Homogeneity of Variances			
Revertantes Raíz Cuadrada			
Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.596	11	60	.123

En el análisis gráfico de los residuales (Figura 7) no se observa patrón alguno (P.ej. conos o “U”), por lo que no debe dudarse del cumplimiento del supuesto.

Figura 7. Gráfico de residuales Vs valores estimados



VI.-CONCLUSIONES

a) ESTADÍSTICAS

- El factor Enzima A es significativo para el modelo.
- No existe interacción estadística entre las enzimas A y B, es decir, no se modifica el efecto del factor Enzima A al modificarse el factor Enzima B y viceversa. Los factores tienen un efecto aditivo.
- La interacción Enzima B*Compuesto tiene un efecto importante en el experimento, ya que es significativa, de tal manera que la modificación de los niveles de los factores enzima B y/o Compuesto tiene un efecto estadísticamente significativo en la respuesta, que en este caso es el número de colonias revertantes inducidas.
- Considerando a las Enzimas de manera individual, se obtuvo que el Compuesto 3 (1,6 Dinitropireno) con la Enzima B es el que reporta un número mayor de revertantes, casi el doble de lo observado con el Compuesto 3 con la Enzima A.
- Los compuestos 1 y 2 (1,3 Dinitropireno y 1,8 Dinitropireno) tienen una respuesta promedio muy similar en presencia de la Enzima B.
- La combinación que produce un número mayor de revertantes inducidos es la que corresponde al Compuesto 3 (1,6 Dinitropireno), cuando se agregan ambas Enzimas.
- La combinación que produce un número menor de revertantes inducidos es la que corresponde al Compuesto 1 en ausencia de Enzimas.

- La transformación de la variable de respuesta que presentó mejores resultados con respecto a la adecuación del modelo y la interpretación desde la perspectiva biológica fue la correspondiente a la raíz cuadrada.

b) BIOLÓGICAS

- La presencia de la Enzima A provoca un incremento estadísticamente significativo en el promedio de colonias revertantes inducidas, lo cual implica un daño mayor a nivel genético.
- La presencia o ausencia de una Enzima (ya sea la Enzima A o B) no afecta el metabolismo de los compuestos por parte de la otra, ya que no se trata de una cadena de reacciones, ni de un metabolismo secuencial. Ambas enzimas tienen cinéticas independientes.
- El hecho de que solamente la Enzima B (Cnr) presente una interacción significativa con el factor Compuesto, se debe a que metaboliza de manera más eficiente los dinitroarenos utilizados, produciendo especies reactivas que dañan el ADN bacteriano y generan un número mayor de colonias revertantes inducidas.
- Considerando a las Enzimas de manera individual, como ya se mencionó, el compuesto que produce un mayor efecto mutagénico es el 3 (1,6 Dinitropireno), con la enzima B (Cnr). Dicho resultado se encuentra dentro de lo esperado y es similar a lo reportado por Salamanca-Pinzón *et al.* (2006). Esto puede deberse a que el 1,6 Dinitropireno es un sustrato que tiene una mayor afinidad con el sitio activo de la enzima B (Cnr), o bien a que el producto es más mutagénico que el compuesto original.
- Los compuestos 1 y 2 (1,3 Dinitropireno y 1,8 Dinitropireno) tienen una respuesta promedio muy similar en presencia de la Enzima B, lo cual implica que el metabolito resultante de la actividad de la Enzima tiene un efecto semejante en el ADN bacteriano y en consecuencia produce respuestas promedio con valores cercanos. Asimismo, se podría deber a que la ubicación de los grupos nitro en las

moléculas (posición 3 y 8) hacen que los compuestos sean sustratos con afinidad semejante con el sitio activo de la Enzima B (Cnr).

- Aunque se estableció que no existen interacciones entre las enzimas, es importante destacar que la combinación que produce un número mayor de revertantes inducidos es la que corresponde al 1,6 Dinitropireno, con la Enzima A (SnrA) y con la Enzima B (Cnr) juntas. Se trata de un efecto aditivo, en virtud de que, como ya se ha mencionado, no existe interacción.

Es importante mencionar que los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo muestran las mismas tendencias observadas en ensayos previos realizados con los mismos compuestos y con NADPH (Com. Pers. Dr. Javier Espinosa Aguirre).

APÉNDICE 1.- Prueba de Durbin-Watson

Uno de los supuestos básicos para obtener un modelo de regresión válido por el método de mínimos cuadrados es que los términos de error deben ser independientes.

De acuerdo con lo expuesto por Durbin y Watson (1950) los supuestos en los que basa la validez del método de mínimos cuadrados, desde la perspectiva del error, son los siguientes:

- a) El error está distribuido independientemente de las variables regresoras, con media cero y varianza constante
- b) Los errores sucesivos están distribuidos independientemente unos de otros.

Cuando se viola alguno de los supuestos ocurre lo siguiente:

- 1.- Los estimados de los coeficientes de regresión, considerados insesgados, no presentarán varianza mínima
- 2.- La fórmula usual de la varianza de un estimado no se puede aplicar y es probable que subestime considerablemente la varianza verdadera.
- 3.- Las distribuciones t y F utilizadas para hacer pruebas de hipótesis pierden su validez.

Considerando lo anterior y debido a que en ocasiones los modelos se obtienen para datos cuyas observaciones sucesivas están correlacionadas serialmente es necesario probar –entre otros- el supuesto en cuestión.

Una de las pruebas más ampliamente utilizadas para probar el supuesto de independencia es la desarrollada por Durbin y Watson (1950, 1951, 1971), la cual se basa en el análisis de los residuales de la regresión calculada, en virtud de que los errores en cualquier caso práctico serán desconocidos (Durbin y Watson 1950). Cabe mencionar que esta prueba únicamente es aplicable en modelos de regresión en los cuales las variables independientes pueden ser consideradas “variables fijas” (Durbin y Watson 1951).

A continuación se presenta, de manera general, el procedimiento para el cálculo del estadístico de prueba:

Considerando que las observaciones satisfacen un modelo de regresión dado de la forma:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon$$

se obtienen los residuales definidos como: $e_{ijk} = y_{ijkl} - y_{ijkl(\text{estimado})}$ y se procede a calcular el estadístico propuesto por Durbin y Watson (1950) que se muestra a continuación:

$$d = \frac{\sum_{t=2}^n (e_t - e_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^n e_t^2}$$

Donde los e_t , $t = 1, 2, \dots, n$, son los residuales de un análisis de mínimos cuadrados ordinario aplicado a los datos. En virtud de que la distribución del estadístico d depende del tamaño de muestra y del número de variables independientes incluidas en el modelo, es necesario contrastar el valor del estadístico calculado con los valores teóricos d_L (límite inferior) y d_U (límite superior) de la distribución propuesta por Durbin y Watson (1951), considerando el valor de significación (α) deseado.

Las hipótesis a contrastar y la regla de decisión correspondiente se presentan a continuación:

Hipótesis	Regla de decisión
H_0 : No hay correlación entre residuales	Si $d < d_L$ se rechaza H_0
H_1 : Hay autocorrelación de primer orden	Si $d > d_U$ no se rechaza H_0 Si $d_L \leq d \leq d_U$ La prueba no es concluyente

De acuerdo con lo anterior, si los errores presentaran una correlación serial positiva, el valor de d sería relativamente pequeño y, por el contrario, si los errores presentaran una correlación serial negativa, el valor calculado del estadístico tendería a ser grande.

Cabe mencionar que actualmente diversos paquetes estadísticos realizan la prueba de manera automática, lo cual hace innecesario el uso de las tablas generadas originalmente por los autores

APÉNDICE 2.- Transformación de Box y Cox

Debido a la posibilidad de que un modelo lineal obtenido no cumpla los supuestos necesarios, Box y Cox (1964) desarrollaron una metodología que permite elegir una transformación de los datos disponibles que permita obtener (Logothetis 1990):

- a) La normalidad de las distribuciones
- b) Constancia de la varianza del error
- c) Simplicidad (linealidad) de la estructura del modelo
- d) Independencia de las observaciones

La metodología desarrollada se basa en el uso de una familia paramétrica de transformaciones de y a y^λ . El parámetro λ , posiblemente un vector, define así, una transformación particular. Dos ejemplos importantes a considerar son:

$$y^\lambda = \begin{cases} \frac{y^\lambda - 1}{\lambda} & (\lambda \neq 0) \\ \log y & (\lambda = 0) \end{cases} \quad (1)$$

$$y^\lambda = \begin{cases} \frac{(y+\lambda_2)^{\lambda_1} - 1}{\lambda_1} & (\lambda_1 \neq 0) \\ \log(y + \lambda_2) & (\lambda_1 = 0) \end{cases} \quad (2)$$

Cabe mencionar que la forma 1 es preferida para el análisis teórico debido a que es continua en $\lambda = 0$. En general se asume que por cada λ , y^λ es una función monótonica de y sobre el rango admisible (Box y Cox 1964). Suponiendo que tenemos un vector de observaciones $n \times 1$ y que el modelo lineal apropiado está especificado por $E(y^\lambda) = a\theta$, donde y^λ es el vector columna de las observaciones transformadas, a es una matriz conocida y θ es un vector de parámetros desconocidos asociados con las observaciones transformadas (Box y Cox 1964).

Así, se puede asumir que para alguna λ desconocida, las observaciones transformadas y_i^λ satisfacen por completo los supuestos de la teoría normal.

Para obtener el valor de λ para un modelo determinado, es necesario obtener los estimadores de máxima verosimilitud que minimicen el valor de la suma de cuadrados del error del modelo.

ANEXO I.-Corridas en Orden Aleatorio y Resultados del Experimento (JMP)

Corrida	Factor			Colonias	Corrida	Factor			Colonias
	Compuesto	Enzima A	Enzima B	Revertantes		Compuesto	Enzima A	Enzima B	Revertantes
1	Compuesto 2		Con B	153	37	Compuesto 3	Con A		210
2	Compuesto 2	Con A	Con B	164	38	Compuesto 2		Con B	111
3	Compuesto 2			106	39	Compuesto 3	Con A		208
4	Compuesto 1	Con A		91	40	Compuesto 2	Con A		149
5	Compuesto 1	Con A	Con B	123	41	Compuesto 3		Con B	217
6	Compuesto 3			141	42	Compuesto 1		Con B	120
7	Compuesto 3		Con B	206	43	Compuesto 3	Con A	Con B	288
8	Compuesto 2	Con A	Con B	142	44	Compuesto 3			130
9	Compuesto 1		Con B	107	45	Compuesto 2		Con B	50
10	Compuesto 1			42	46	Compuesto 1	Con A	Con B	129
11	Compuesto 3	Con A	Con B	237	47	Compuesto 1		Con B	100
12	Compuesto 1			59	48	Compuesto 2	Con A		103
13	Compuesto 2			104	49	Compuesto 3	Con A		210
14	Compuesto 2	Con A		109	50	Compuesto 3	Con A	Con B	232
15	Compuesto 2	Con A		96	51	Compuesto 1	Con A	Con B	108
16	Compuesto 2		Con B	115	52	Compuesto 2	Con A		116
17	Compuesto 3			143	53	Compuesto 2			81
18	Compuesto 1	Con A		99	54	Compuesto 1	Con A		83
19	Compuesto 3		Con B	189	55	Compuesto 2	Con A	Con B	146
20	Compuesto 1			40	56	Compuesto 3	Con A	Con B	274
21	Compuesto 3		Con B	208	57	Compuesto 3	Con A		193
22	Compuesto 1	Con A	Con B	96	58	Compuesto 1	Con A		50
23	Compuesto 3	Con A	Con B	316	59	Compuesto 3	Con A		198
24	Compuesto 2			98	60	Compuesto 3	Con A	Con B	298
25	Compuesto 1	Con A	Con B	186	61	Compuesto 1			44
26	Compuesto 2			123	62	Compuesto 3			157
27	Compuesto 2		Con B	77	63	Compuesto 1		Con B	92
28	Compuesto 3			132	64	Compuesto 3	Con A		181
29	Compuesto 1			55	65	Compuesto 1	Con A		87
30	Compuesto 1		Con B	101	66	Compuesto 1	Con A	Con B	128
31	Compuesto 3		Con B	291	67	Compuesto 3		Con B	223
32	Compuesto 2	Con A	Con B	155	68	Compuesto 2			59
33	Compuesto 2	Con A		144	69	Compuesto 2		Con B	91
34	Compuesto 1		Con B	119	70	Compuesto 2	Con A	Con B	147
35	Compuesto 1			38	71	Compuesto 3			144
36	Compuesto 1	Con A		99	72	Compuesto 2	Con A	Con B	122

ANEXO II.-Número de Colonias Revertantes para los Controles del Experimento

NEGATIVOS

		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	100 µL bacterias	48	39	31
2	100 µL bacterias + 50 µL DMSO + 100 µL Enzima A + 10 µL NADPH + 110 µL Buffer	48	45	36
3	100 µL bacterias + 50 µL DMSO + 100 µL Enzima A + 10 µL NADPH + 110 µL Buffer	31	33	41
4	100 µL bacterias + 50 µL DMSO + 100 µL Enzima A + 100 µL Enzima B + 10 µL NADPH + 10 mL Buffer	43	42	32

POSITIVOS

		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
5	100 µL bacterias + 50 µL 1-NP + 10 µL NADPH + 210 µL Buffer	114	162	103
6	100 µL bacterias + 50 µL 1-NP + 100 µL Enzima A + 10 µL NADPH + 110 µL Buffer	256	265	261
7	100 µL bacterias + 50 µL 1-NP + 100 µL Enzima B + 10 µL NADPH + 110 µL Buffer	395	383	522
8	100 µL bacterias + 50 µL 1-NP + 100 µL Enzima A + 100 µL Enzima B + 10 µL NADPH + 10 mL Buffer	341	384	440

ANEXO III.- Análisis de Resultados sin Transformar la Variable de Respuesta

Como se aprecia en la Tabla I, La “R cuadrada ajustada” indica que el 87.31 % de la variación de los datos es explicada por el modelo, por lo cual se puede decir que el modelo es “adecuado” para describir los datos.

Tabla I. Resumen de ajuste del modelo

Summary of Fit	
RSquare	0.892842
RSquare Adj	0.873197
Root Mean Square Error	23.33214
Mean of Response	138.5278
Observations (or Sum Wgts)	72

Como se aprecia en la Tabla II, el modelo es significativo, y al interpretar la Tabla III se concluye lo siguiente:

No se rechaza H_0 para las hipótesis **F** y **G** (interacciones), ya que $p > 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- No existe interacción para ningún nivel de la enzima A con ningún nivel de la enzima B.
- No existe interacción para ningún compuesto con ningún nivel de las enzimas A y B.

Se rechaza H_0 para la hipótesis **E** (interacción), ya que $p < 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- Existe interacción para alguno de los compuestos con uno de los niveles de la enzima B

No se rechaza H_0 para la hipótesis **D** (interacción), ya que $p > 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- No existe interacción para alguno de los compuestos con uno de los niveles de la enzima A

Se rechaza H_0 para la hipótesis **B**, ya que $p < 0.05$, por lo que podemos concluir que:

- El efecto de uno de los niveles de la enzima A es diferente de cero.

Tabla II. Análisis de varianza del modelo

Analysis of Variance				
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	11	273244.49	24840.4	45.4733
Error	60	32775.83	546.3	Prob > F
C. Total	71	306020.32		<.0001*

Tabla III. Pruebas para los efectos de los factores e interacciones

Effect Tests					
Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Compuesto	2	2	185650.03	170.5123	<.0001*
Enzima A	1	1	28880.06	53.0504	<.0001*
Enzima B	1	1	42437.56	77.9545	<.0001*
Compuesto*Enzima A	2	2	1982.19	1.8206	0.1708
Compuesto*Enzima B	2	2	12003.69	11.0249	<.0001*
Enzima A*Enzima B	1	1	0.00	0.0000	1.0000
Compuesto*Enzima A*Enzima B	2	2	1199.08	1.1013	0.3391

De acuerdo con lo anterior, y en virtud de que no se deben evaluar efectos principales en presencia de interacciones que los contengan, se realizaron las pruebas correspondientes para analizar el efecto de la Enzima A y la interacción del Compuesto con la Enzima B, ya que en ambos casos se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

EFEECTO DE LA ENZIMA A: En la tabla IV se aprecia que existen diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta promedio con y sin la enzima A, lo cual implica que el nivel de este factor tiene un efecto significativo en las colonias revertantes observadas. Asimismo, en la Figura 1 se aprecia que en presencia de la enzima A, el promedio de colonias revertantes es mayor que en ausencia de la misma.

Tabla IV. Prueba t de Student para las medias de la respuesta con los dos niveles de la Enzima A

LSMeans Differences Student's t

$\alpha = 0.050$ $t = 2.0003$

		LSMean[j]	
Mean[i]-Mean[j]		Con A	Sin A
Std Err Dif			
Lower CL Dif			
Upper CL Dif			
LSMean[i]	Con A	0	40.0556
		0	5.49944
		0	29.055
		0	51.0561
Sin A	-40.056	0	
	5.49944	0	
	-51.056	0	
	-29.055	0	

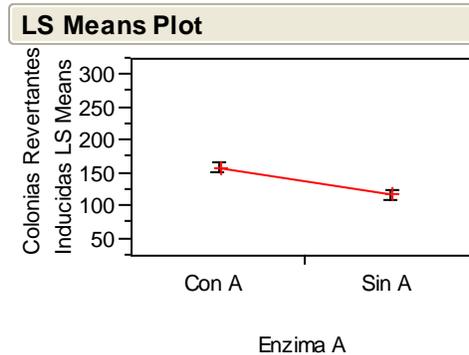
Level Least Sq Mean

Con A A 158.55556

Sin A B 118.50000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Figura 1. Gráfico de respuestas promedio con y sin la Enzima A



INTERACCIÓN COMPUESTO*ENZIMA B: En vista de que solamente una interacción doble es estadísticamente significativa, se procedió a hacer el análisis correspondiente.

De acuerdo con la Tabla V, se aprecia que las respuestas medias forman 4 grupos homogéneos. Cabe destacar que el mayor número de colonias revertantes inducidas se obtiene al aplicar el compuesto 3 con la enzima B. Asimismo, se observa que con la enzima B los compuestos 1 y 2 se comportan de manera casi idéntica (Figura 2). En ausencia de la enzima B los compuestos producen un daño progresivo en el siguiente orden 1, 2, 3 (Figura 2). Es de particular interés el hecho de que el compuesto 2 con y sin la enzima B

pertenezcan a un grupo homogéneo junto con el compuesto 1 con la enzima B. Esto podría implicar que, al menos, con el compuesto 2, la enzima B no tiene un efecto estadísticamente significativo en el número de colonias revertantes inducidas obtenidas.

En el análisis de rebanadas (“Slices”)(Tabla VI) se aprecia que para los compuestos 1 y 3 existen diferencias estadísticamente significativas, es decir, al mantener constante el compuesto hay efecto de la enzima B. En el caso del compuesto 2 se aprecia que no existe diferencia significativa en el promedio de colonias en presencia o ausencia de la Enzima B.

Por otra parte, en la Tabla VI (“Slices”) se observa que al analizar los casos en los que se tiene la Enzima B y en los que no se tiene (“Con B” y “Sin B” respectivamente), cada uno de los tres compuestos tiene un efecto medio diferente. Esta afirmación se hace evidente al observar la Figura 2, en la que de acuerdo con lo expuesto por Kuehl (2001), se trata de una interacción con diferencia en la magnitud de la respuesta.

Finalmente, en la Figura 3 se aprecia que en los perfiles de interacción existe, como ya se ha mencionado interacción entre los factores: compuesto y enzima B.

Tabla V. Prueba de Tukey para medias de compuesto y enzima B

LSMeans Differences Tukey HSD						
α= 0.050 Q= 2.9438						
LSMean[j]						
Mean[i]-Mean[j]	Compuesto 1,Con B	Compuesto 1,Sin B	Compuesto 2,Con B	Compuesto 2,Sin B	Compuesto 3,Con B	Compuesto 3,Sin B
Std Err Dif						
Lower CL Dif						
Upper CL Dif						
Compuesto 1,Con B	0	51.8333	-5.3333	10.0833	-130.83	-52.417
	0	9.52531	9.52531	9.52531	9.52531	9.52531
	0	23.7927	-33.374	-17.957	-158.87	-80.457
	0	79.874	22.7073	38.124	-102.79	-24.376
Compuesto 1,Sin B	-51.833	0	-57.167	-41.75	-182.67	-104.25
	9.52531	0	9.52531	9.52531	9.52531	9.52531
	-79.874	0	-85.207	-69.791	-210.71	-132.29
	-23.793	0	-29.126	-13.709	-154.63	-76.209
Compuesto 2,Con B	5.33333	57.1667	0	15.4167	-125.5	-47.083
	9.52531	9.52531	0	9.52531	9.52531	9.52531
	-22.707	29.126	0	-12.624	-153.54	-75.124
	33.374	85.2073	0	43.4573	-97.459	-19.043
Compuesto 2,Sin B	-10.083	41.75	-15.417	0	-140.92	-62.5
	9.52531	9.52531	9.52531	0	9.52531	9.52531
	-38.124	13.7094	-43.457	0	-168.96	-90.541
	17.9573	69.7906	12.624	0	-112.88	-34.459
Compuesto 3,Con B	130.833	182.667	125.5	140.917	0	78.4167
	9.52531	9.52531	9.52531	9.52531	0	9.52531
	102.793	154.626	97.4594	112.876	0	50.376
	158.874	210.707	153.541	168.957	0	106.457
Compuesto 3,Sin B	52.4167	104.25	47.0833	62.5	-78.417	0
	9.52531	9.52531	9.52531	9.52531	9.52531	0
	24.376	76.2094	19.0427	34.4594	-106.46	0
	80.4573	132.291	75.124	90.5406	-50.376	0

Level	Least Sq Mean
Compuesto 3,Con B A	248.25000
Compuesto 3,Sin B B	169.83333
Compuesto 2,Con B C	122.75000
Compuesto 1,Con B C	117.41667
Compuesto 2,Sin B C	107.33333
Compuesto 1,Sin B D	65.58333

Levels not connected by same letter are significantly different.

Figura 2. Gráfico de respuestas promedio con y sin la enzima B

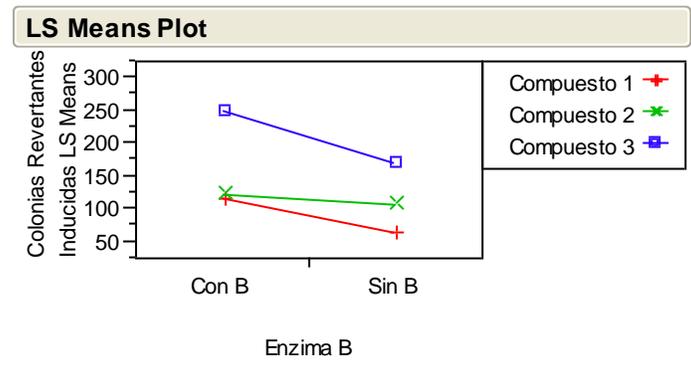
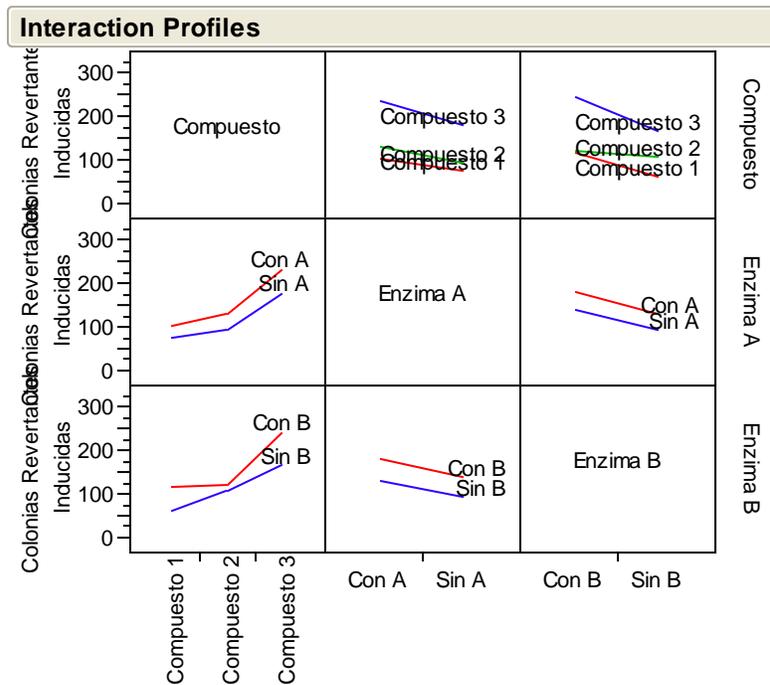


Tabla VI. Prueba de significancia de un factor manteniendo constante el nivel del otro factor (“Slices”)

Slice Compuesto=Compuesto 1		Slice Compuesto=Compuesto 2		Slice Compuesto=Compuesto 3	
Sum of Squares	16120.166667	Sum of Squares	1426.0416667	Sum of Squares	36895.041667
Numerator DF	1	Numerator DF	1	Numerator DF	1
Denominator DF	60	Denominator DF	60	Denominator DF	60
F Ratio	29.611490968	F Ratio	2.6195275028	F Ratio	67.773318706
Prob > F	1.0278183e-6	Prob > F	0.1108012313	Prob > F	1.968234e-11

Slice Enzima B=Con B		Slice Enzima B=Sin B	
Sum of Squares	131584.22222	Sum of Squares	66069.5
Numerator DF	2	Numerator DF	2
Denominator DF	60	Denominator DF	60
F Ratio	120.8549852	F Ratio	60.682263496
Prob > F	9.054149e-22	Prob > F	3.872283e-15

Figura 3. Perfiles de interacción para el experimento



VERIFICACIÓN DE LOS SUPUESTOS

INDEPENDENCIA: Como se busca definir si existe correlación o “patrones” entre los residuales del modelo, se aplica la prueba de Durbin-Watson (Ver APÉNDICE 1) bajo las siguientes hipótesis:

H_0 : No hay correlación entre residuales
 H_1 : Hay autocorrelación de primer orden

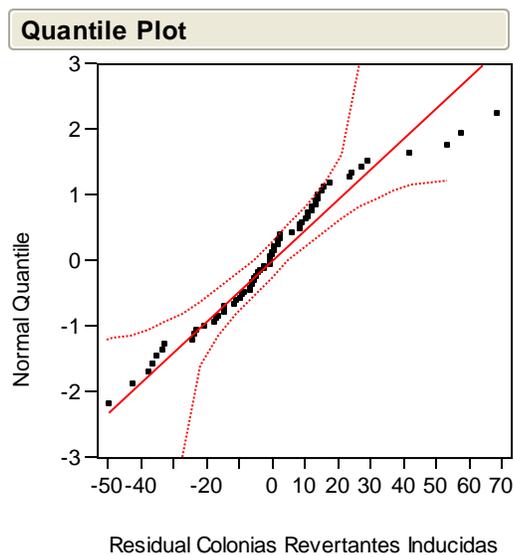
En la Tabla VI se aprecia que $p < 0.05$, por lo que se rechaza H_0 y se concluye que hay autocorrelación positiva entre los residuales.

Tabla VI. Cálculo del estadístico de Durbin-Watson

Durbin-Watson			
Durbin-Watson	Number of Obs.	AutoCorrelation	Prob<DW
1.4732243	72	0.2108	0.0142*

NORMALIDAD: Este supuesto implica que los residuales se distribuyen normalmente. Al graficar los residuales, como se aprecia en la Figura 3, aparentemente se distribuyen normalmente, aunque los de la cola superior de la distribución se encuentran muy dispersos.

Figura 3. Gráfico normal de cuantiles para la distribución de los residuales



Para corroborar lo anterior se van a realizar la pruebas correspondientes bajo las siguientes hipótesis:

H_0 : Los datos provienen de una distribución normal

H_a : Los datos no provienen de una distribución normal

Como se observa en la Tabla VII, $p < 0.05$, por lo tanto se rechaza H_0 y se concluye que la distribución no es normal. Para verificar si se puede lograr una distribución normal de los residuales se realizó una transformación logarítmica (Ln) de la variable de respuesta (Ver ANEXO IV).

Tabla VII. Prueba Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los residuales del modelo obtenido

Goodness-of-Fit Test	
Shapiro-Wilk W Test	
W	Prob<W
0.957419	0.0158*
Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.	

HOMOSCEDASTICIDAD: Este supuesto implica la igualdad de varianzas entre las colonias revertantes inducidas agrupadas por tratamiento.

Para probar el supuesto se procede a contrastar las siguientes hipótesis:

$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4 = \sigma^2_5 = \sigma^2_6 = \sigma^2_7 = \sigma^2_8 = \sigma^2_9 = \sigma^2_{10} = \sigma^2_{11} = \sigma^2_{12}$

H_1 : Al menos un par de σ^2 son diferentes

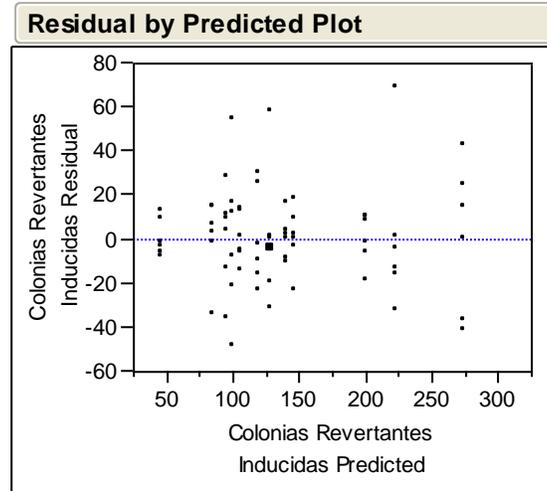
Como se observa en la Tabla VII, $p > 0.05$, por lo tanto no se rechaza H_0 y se concluye que hay homogeneidad de varianzas.

Tabla VII. Prueba de Levene para probar la homogeneidad de varianzas en la variable de respuesta

Test of Homogeneity of Variances			
Revertantes			
Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.685	11	60	.099

En el análisis gráfico de los residuales (Figura 4), no se aprecian patrones definidos, lo cual es coherente con lo observado en la Tabla VII.

Figura 4. Gráfico de residuales Vs valores estimados



ANEXO IV.-Análisis de Resultados Aplicando una Transformación Logarítmica (Ln) a la Variable de Respuesta

En éste apartado únicamente se realizaron las pruebas de los supuestos para conocer si la transformación logarítmica mejoraba significativamente los resultados con respecto al cumplimiento de los supuestos del modelo.

INDEPENDENCIA: Como se busca definir si existe “correlación” o “patrones” entre los residuales del modelo, se aplica la prueba de Durbin-Watson (Ver APÉNDICE 1) bajo las siguientes hipótesis:

H₀: No hay correlación entre residuales
H₁: Hay autocorrelación de primer orden

Como se aprecia en la Tabla I, $p > 0.05$, por lo tanto no se rechaza H₀ y se concluye que no existe autocorrelación entre los residuales. Esta prueba aumenta su nivel de significancia con los datos con transformación logarítmica.

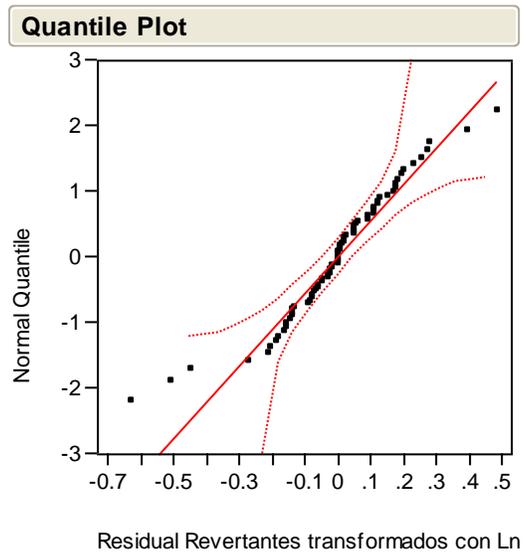
Tabla I. Cálculo del estadístico de Durbin-Watson

Durbin-Watson			
Durbin-Watson	Number of Obs.	AutoCorrelation	Prob<DW
1.6794909	72	0.1018	0.0999

NORMALIDAD: Este supuesto implica que los residuales se distribuyen normalmente.

Al graficar los residuales, como se aprecia en la Figura 1, aparentemente se distribuyen normalmente. El gráfico no difiere considerablemente del obtenido sin la transformación logarítmica, aunque cabe destacar que mejora la cola superior.

Figura 1. Grafico normal de cuantiles para la distribución de los residuales



Para corroborar lo anterior se van a realizar las pruebas correspondientes bajo las siguientes hipótesis:

H_0 : Los datos provienen de una distribución normal

H_a : Los datos no provienen de una distribución normal

Como se observa en la Tabla II el valor de p disminuye considerablemente, de tal manera que podemos concluir que la transformación tiene como consecuencia directa el alejamiento de la distribución normal. Como $p < 0.05$, se rechaza H_0 y se concluye que la distribución no es normal.

Tabla II. Prueba Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los residuales del modelo obtenido

Prueba	p-value (Variable de respuesta sin transformación)	p-value (variable de respuesta con transformación logarítmica (Ln))
Shapiro-Wilk	0.0158	0.0068

HOMOSCEDASTICIDAD: Este supuesto implica la igualdad de varianzas entre las colonias revertantes inducidas agrupadas por tratamiento y transformadas aplicando logaritmo.

Para probar el supuesto se procede a contrastar las siguientes hipótesis:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4 = \sigma^2_5 = \sigma^2_6 = \sigma^2_7 = \sigma^2_8 = \sigma^2_9 = \sigma^2_{10} = \sigma^2_{11} = \sigma^2_{12}$$

H_1 : Al menos un par de σ^2 son diferentes

Como se observa en al Tabla III, $p < 0.05$, por lo tanto se rechaza H_0 y se concluye que no hay homogeneidad de varianzas. Cabe destacar que el valor de “p” disminuye considerablemente con respecto al observado en el análisis con la variable de respuesta sin la transformación logarítmica.

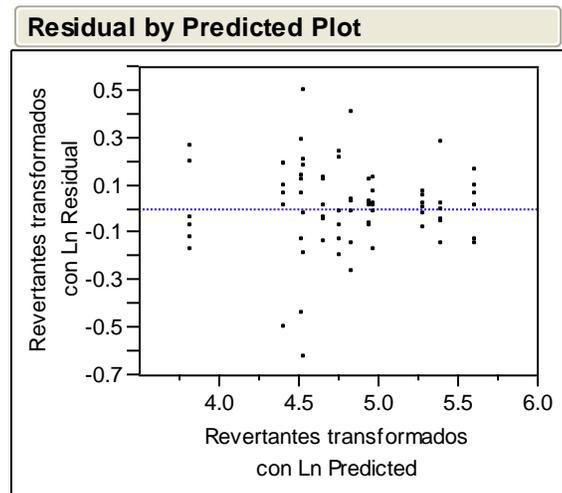
Tabla III. Prueba de Levene para probar la homogeneidad de varianzas en la variable de respuesta

Test of Homogeneity of Variances

Revertantes Transformados con Ln			
Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
2.124	11	60	.032

En el análisis gráfico de los residuales (Figura 2) no se observa patrón alguno (P.ej. conos o “U”), aunque los resultados de la Tabla III hacen dudar sobre el cumplimiento del supuesto.

Figura 2. Gráfico de residuales Vs valores estimados



ANEXO V.- Análisis de Resultados Aplicando una Transformación de Box-Cox a la Variable de Respuesta.

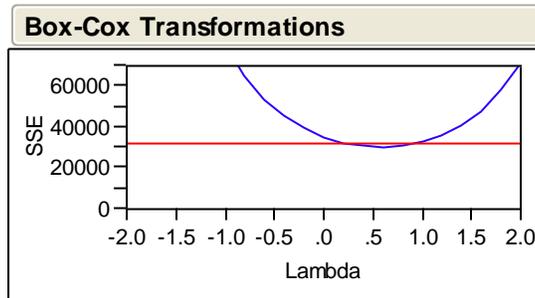
En primer lugar se procedió a aplicar una transformación de Box-Cox (Ver APÉNDICE 2) a la variable de respuesta de acuerdo con la Ecuación 1.

$$Y = (\text{Colonias Revertantes inducidas}^{\lambda} - 1) / w^* \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Los valores de λ y w se obtuvieron del análisis en JMP. En la Figura 1 se observa que el valor óptimo de λ se encuentra entre 0.5 y 1.0, de manera que se obtiene la Ecuación 2.

$$Y = (\text{Colonias Revertantes Inducidas}^{0.6} - 1) / 0.08739473363465 \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

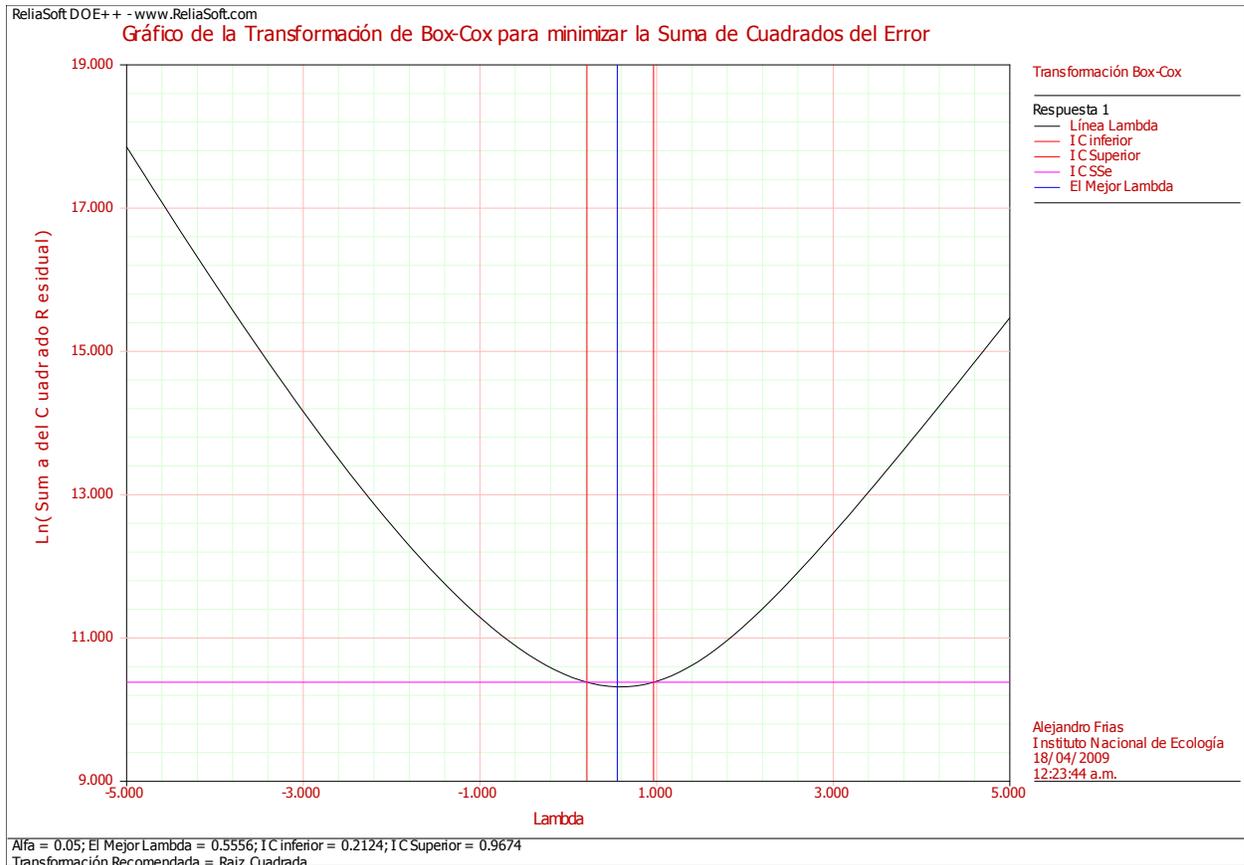
Figura 1. Gráfico del valor de lambda (λ) para estabilizar la varianza



Asimismo, al analizar los resultados con el programa DOE++[®] (Relia Soft), como se observa en la Figura 2, se obtienen valores similares a los obtenidos en JMP y se aprecia que el intervalo de confianza al 95% para λ se encuentra entre 0.2124 y 0.9674, además de que se sugiere una transformación con raíz cuadrada, es decir, de $y^{1/2}$.

* $w = \lambda(GM(y))^{\lambda-1}$, en virtud de que JMP utiliza la transformación propuesta por Box y Cox (1964)
 $y^{\lambda} = \frac{y^{\lambda} - 1}{\lambda(GM(y))^{\lambda-1}}$, donde $GM(y)$ es la media geométrica de las observaciones.

Figura 2. Gráfico de la transformación de Box-Cox para minimizar la suma de cuadrados del error



Con base en los resultados obtenidos al analizar en JMP los datos con la variable de respuesta transformada con la Ecuación 2, se realizaron las pruebas para verificar el cumplimiento de los supuestos. Lo anterior, a fin de verificar si la transformación de Box-Cox permite el cumplimiento de los supuestos en mejores condiciones que las observadas en los análisis previos (Ver ANEXO III y ANEXO IV). La verificación de los supuestos se presenta a continuación:

INDEPENDENCIA: Como se busca definir si existe “correlación” o “patrones” entre los residuales del modelo, se aplica la prueba de Durbin-Watson (Ver APÉNDICE 1) bajo las siguientes hipótesis:

H_0 : No hay correlación entre residuales
 H_1 : Hay autocorrelación de primer orden

Como se aprecia en la Tabla I, $p < 0.05$, por lo tanto se rechaza H_0 y se concluye que existe autocorrelación entre los residuales. Esta prueba disminuye su nivel de significancia con los datos con transformación de Box-Cox.

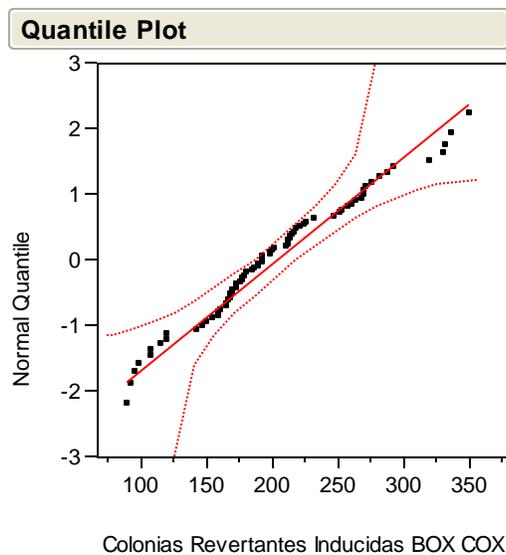
Tabla I. Cálculo del estadístico de Durbin-Watson

Durbin-Watson			
Durbin-Watson	Number of Obs.	AutoCorrelation	Prob<DW
1.5129266	72	0.1835	0.0220*

NORMALIDAD: Este supuesto implica que los residuales se distribuyen normalmente.

Al graficar los residuales, como se aprecia en la Figura 3, aparentemente se distribuyen normalmente. El gráfico no difiere considerablemente del obtenido sin la transformación logarítmica, aunque cabe destacar que mejora la cola superior.

Figura 3. Grafico normal de cuantiles para la distribución de los residuales



Para corroborar lo anterior se van a realizar las pruebas correspondientes bajo las siguientes hipótesis:

H_0 : Los datos provienen de una distribución normal
 H_a : Los datos no provienen de una distribución normal

Como se observa en la Tabla II, el valor de p aumenta considerablemente, de tal manera que podemos concluir que la transformación tiene como consecuencia directa la aproximación a una distribución normal. Como $p > 0.05$, no se rechaza H_0 y se concluye que la distribución de los residuales con la transformación de Box-Cox es normal.

Tabla II. Comparación de valores de “p” para la prueba Shapiro-Wilk con los residuales calculados con la variable de respuesta sin transformación, con transformación logarítmica y con la variable de respuesta aplicando la transformación de Box-Cox.

Prueba	p-value (sin transformación)	p-value (con transformación logarítmica)	p-value (variable de respuesta con transformación de Box-Cox)
Shapiro-Wilk	0.0158	0.0068	0.1118

HOMOSCEDASTICIDAD: Este supuesto implica la igualdad de varianzas de las colonias revertantes inducidas entre tratamiento. Entonces, se procedió a realizar la prueba de Levene con la variable de respuesta transformada.

Para probar el supuesto se procede a contrastar las siguientes hipótesis:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4 = \sigma^2_5 = \sigma^2_6 = \sigma^2_7 = \sigma^2_8 = \sigma^2_9 = \sigma^2_{10} = \sigma^2_{11} = \sigma^2_{12}$$

H_1 : Al menos un par de σ^2 son diferentes

Como se observa en al Tabla III, $p > 0.05$, por lo tanto no se rechaza H_0 y se concluye que hay homogeneidad de varianzas. Cabe destacar que el valor de “p” aumenta considerablemente con respecto al observado en el análisis con la variable de respuesta con transformación logarítmica (Ln).

Tabla III. Prueba de Levene para probar la homogeneidad de varianzas en la variable de respuesta

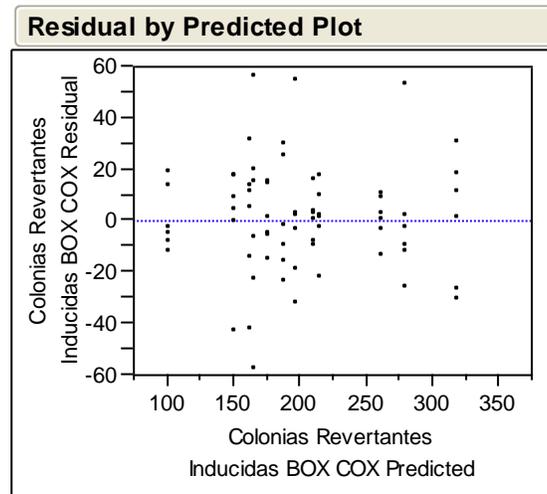
Test of Homogeneity of Variances

Revertantes Box-Cox

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.553	11	60	.137

En el análisis gráfico de los residuales (Figura 4) no se observa patrón alguno (P.ej. conos o “U”).

Figura 4. Gráfico de residuales Vs valores estimados



REFERENCIAS

- Alfheim I., Becher G., Hongslo J.K. y Ramdahl T. (1984). Mutagenicity testing of high performance liquid chromatography fractions from wood stove emission samples using a modified *Salmonella* assay requiring smaller sample volumes. *Environ. Mutagen.* 6, 91-102.
- Ames B.N., Lee F.D. y Durston W.D. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)*. 70, 782-786.
- Ames B.N., McCan J. y Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Arimochi H., Kinouchi T., Kataoka K., Kuwahara T. y Ohnishi Y. (1997). Activation of 1-nitropyrene by nitroreductases increases DNA adduct level and mutagenicity. *J. Med. Invest.* 3-4, 193-198.
- Arimoto S., Negishi K. y Hayatsu H. (1981). A modification of the Ames test procedure: accelerated growth of the his⁺ revertants. *Mutat. Res.* 4-5, 407-411.
- Arni P., Dollenmeier P. y Müller D. (1985). Automated modification of the Ames test with COBAS bact. *Mutat. Res.* 3, 137-140.
- Arni P. y Müller D. (1988). Automated modification of the Ames test with COBAS bact: evaluation of results and experimental design. *Mutat. Res.* 3, 227-228.
- Atkinson A.C. y Bailey R.A. (2001). One hundred years of the design of experiments on and off the pages of *Biometrika*. *Biometrika* 88, 53-97.
- Bagley S.T., Stoltz S.L., Becker D.M. y Keen R.E. (1992). Characterization of organic extracts from standard reference materials 1649, "urban dust/organics", and 1650, "diesel particulate matter", using a microsuspension assay. A WHO/IPCS/CSCM study. *Mutat. Res.* 276, 81-86.
- Box G.E.P. y Cox D.R. (1964). An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 26, 2, 211-252.
- Box G.E.P., Hunter W.G. y Hunter J.S. (2001). *Estadística para investigadores*. Editorial Reverté, S.A. México. 675p.
- Carroll C., Warnakulasuriyachchi D., Nakhbeh M. y Lambert I. (2002). *Salmonella typhimurium* mutagenicity tester strains that overexpress oxygen-insensitive nitroreductases nfsA and nfsB. *Mutat. Res.*, 501: 79-98

Claxton L.D., Allen J., Auletta A., Mortelmans K., Nestmann E. y Zeiger E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium* / mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutat. Res.* 189, 83-91.

Claxton L.D., Creason J., Leroux B., Agurell E., Bagley S., Bryant D.W., Courtois Y.A., Douglas G., Clare C.B., Goto S., Quillardet P., Jagannath D.R., Kataoka K., Mohn G., Nielsen P.A., Ong T., Pederson T.C., Shimizu H., Nylund L., Tokiwa H., Vink G.J., Wang Y. y Warshawsky D. (1992). Results of the IPCS collaborative study on complex mixtures. *Mutat. Res.* 276, 23-32.

Cochran W.G. y Cox G.M. (1965). *Diseños Experimentales*. Editorial trillas, México. 661p.

Cornet M., Castelain P., Vercruyse A., Laib R., Krisch-volders M. y Rogieris V. (1992). Mutagenicity of 2-methylpropene (isobutene) and its epoxide in a modified *Salmonella* assay for volatile compounds. *Mutat. Res.* 3, 213-221.

Cox D.R. y Reid N. (2000). *The Theory of the Design Of Experiments*. Chapman & Hall, U.S.A. 323p.

Dean A. y Voss D. (1999). *Design and Analysis of Experiments*. Springer-Verlag New York, U.S.A. 740p.

Durbin J. y Watson G.S. (1950). Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression: I. *Biometrika*. 37: 3/4, 409-428.

Durbin J. y Watson G.S. (1951). Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression: II. *Biometrika*. 38: 1/2, 159-177.

Durbin J. y Watson G.S. (1971). Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression: III. *Biometrika*. 58: 1, 1-19.

Einistö P., Watanabe M., Ishidate M. y Nohmi T. (1991). Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitrorreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutat. Res.* 259, 95-102.

Ferre J.F. y Ruis F.X. (2004). *Introducción al Diseño Estadístico de Experimentos*. Universitat Rovira y Virgili. Tarragona, España. www.quimica.urv.es/quimio.

Filipic M. y Toman M.J. (1996). Ecotoxicological studies using modified Ames bioassay. *Water Sci. Technol.* 7-8, 1-7.

García-Díaz A. y Phillips D.T. (1995). *Principles of Experimental Design and Analysis*. Chapman & Hall, Inc. U.K. 409p.

Georghiou P.E., Blagden P.A., Winsor L. y Williams D.T. (1989). Spontaneous revertants in modified *S. typhimurium* mutagenicity tests employing elevated numbers of the tester strain. *Mutat. Res. Lett.* 1-2, 33-39.

Goto S., Endo O. y Matsushita H. (1992). Results of a comparative study on the Salmonella pre-incubation and plate incorporation assays using test samples from the IPCS collaborative study. Mutat. Res. 276, 93-100.

Haak T., Erdinger T. y Boche G. (2001). Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. Mutat. Res. 491, 183-193.

Josephy P.D., Gruz P. y Nohmi T. (1997). Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. Mutat. Res. 386, 1-23.

Kappers W.A., Van Och F.M.M., de Groene E.M. y Horbach G.J. (2000). Comparison of three different in vitro mutation assays used for the investigation of cytochrome P450-mediated mutagenicity of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutat. Res. 466, 143-159.

Kielhorn J., Wahnschaffe U. y Mengelsdorf I. (2003). Metabolism and activation of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons-new aspects. Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol Research. www.item.fraunhofer.de

Kuehl R.O. (2001). Diseño de Experimentos. Thomson Editores, S.A. de C.V. México. 665p.

Lo P., Yu R., Chou Ch. y Huang E. (2004). Determination of the mutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo(a)pyrene by a modified Ames test. Int. J. Food Microbiol. 2, 249-257.

Logothetis N. (1990). Box-Cox Transformations and the Taguchi Method. Appl. Statist. 39, 1, 31-48.

Lorenzen T.J. y Anderson V.L. (1993). Design of Experiments. A no-name Approach. Marcel Dekker, Inc. 414p. (Capítulo 3: Factorial Designs. 53-125pp).

Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113, 173-215.

Matsushita H., Endo O., Goto S., Shimizu H., Matsumoto H., Tamakawa K., Endo T., Sakabe Y., Tokiwa H. y Ando M. (1992). Collaborative study using the preincubation *Salmonella typhimurium* mutation assay for airborne particulate matter in Japan. A trial to minimize interlaboratory variation. Mutat. Res. 227, 1-12.

McCann J. y Ames B.N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 73, 950-954.

Méndez-Ramírez I., Namihira-Guerrero D., Moreno-Altamirano L. y Sosa de Martínez C. (2006). El Protocolo de Investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. Editorial Trillas, S.A. de C.V., México. 210pp.

Meshram G.P. y Rao K.M. (1988). Mutagenicity of metyl isocyanate in the modified test conditions of Ames Salmonella/microsome liquid-preincubation procedure. *Mutat. Res.* 2, 123-129.

Montgomery D.C. (2004). Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Limusa S.A. de C.V. México. 686p.

Mortelmans K. y Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella* mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.

Nylund L., Hakala E. y Sorsa M. (1992). Application of a semi-automated SOS chromotest for measuring genotoxicities of complex environmental mixtures containing polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 276, 125-132.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2003). OECD Guidelines for testing of chemicals. Overview of currently available test guidelines. www.oecd.org.

O'Hare S. y Atterwill C.K. (1995). In vitro toxicity testing protocols. Totowa Press, Nueva Jersey, 255 p.

Paterson S., Boucher S. y Lambert B. (2002). Regulation of the *nfsA* gene in *Escherichia coli* by SoxS. *Journal of Bacteriology*, 184 (1): 51-58

Poth A. y Heidemann A. (1994). Modified ames test with 21 commercial azo dyes metabolic activation by liver S9 from rats and hamsters. *Toxicol. Lett.* 1, 66.

Prvan T. y Street D.J. (2002). An annotated bibliography of application papers using certain classes of fractional factorial and related designs. *Journal of Statistical Planning and Inference.* 106, 245-269.

Rosenkranz H.S. y Mermelstein R. (1983). Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat. Res.* 114, 217-267.

Ryan T.P. (2007). Modern Experimental Design. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 593p.

Salamanca-Pinzón S.G., Camacho-Carranza R., Hernández-Ojeda S.L. y Espinoza-Aguirre J.J. (2006). Nitrocompound activation by cell-free extracts of nitroreductase-proficient *Salmonella typhimurium* strains. *Mutegenesis.* 6, 369-374.

Schabenberger O. y Pierce F.J. (2002). Contemporary Statistical Models For The Plant And Soil Sciences. Taylor & Francis Group. Boca Ratón, Florida. 738 p.

Stamm S.C., Zhong B.-Z., Whong W.-Z. y Ong W.T. (1994). Mutagenicity of coal-dust and smokeless-tobacco extracts in *Salmonella typhimurium* strains with differing levels of O-acetyltransferase activities. *Mutat. Res.* 321, 253-264.

Tatsumi K., Doi T., Yoshimura H., Koga H. y Horiuchi T. (1982). Oxygen-insensitive nitrofurán reductases in *Salmonella typhimurium* TA100. *Journal of Pharmacobio-Dynamics.* 5:423-9.

Tokiwa H., Horikawa K. y Sera N. (1992). Influence of the microsomal inducer and the incubation system on mutagenicity of complex mixtures. *Mutat. Res.* 276, 139-144.

Yamada M., Espinoza-Aguirre J.J., Watanabe M., Matsui K., Sofuni T. y Nohmi T. (1997). Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase anzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538. *Mutat. Res.* 375, 9-17.