

00381 38



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DEL POSIBLE PAPEL ADAPTATIVO DE LAS VARIANTES DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE POBLACIONES NATURALES DE *DROSOPHILA* DE LAGUNA VERDE, VER., MÉXICO.

TESIS

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

P R E S E N T A

ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ESTHER DE LA ROSA DUQUE

27/982



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

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO: FCEN/DEP/1211/2000

DRA. MA. ESTHER DE LA ROSA DUQUE

Presente

Por este conducto me permito comunicarle que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) **M. EN C. ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA**, quién desarrolló el trabajo de tesis titulado: Estudio del posible papel adaptativo de las variantes de la superóxido dismutasa en poblaciones naturales de *Drosophila* de Laguna Verde, Veracruz, México.

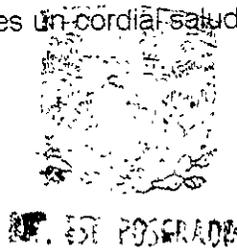
Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, los ha designado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGIA).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DR.	RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI
PRIMER VOCAL	DR.	MANUEL URIBE ALCOCER
SEGUNDO VOCAL	: DRA.	SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO
TERCER VOCAL	: DRA.	PATRICIA RAMOS MORALES
SECRETARIO	: DRA.	MARIA ESTHER DE LA ROSA DUQUE
SUPLENTE	: DRA.	ISABEL JUDITH GUZMAN RINCON
SUPLENTE	: DR.	VICTOR MANUEL SALCEDA SACANELLES

FACULTAD DE CIENCIAS

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 15 de Agosto de 2000
JEFE DE LA DIVISIÓN



Margarita Collazo Ortega
DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

ESTA INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE
DROSOPHILA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DEL Instituto Nacional de
Investigaciones Nucleares Y FORMA PARTE DEL PROYECTO TITULADO
“*POBLACIONES NATURALES DE DROSOPHILA COMO INDICADORES
BIOLOGICOS*”.

EXPRESO MI AGRADECIMIENTO

A LA Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque Y MI RECONOCIMIENTO POR LA ASESORIA, APOYO, CONFIANZA Y DISPONIBILIDAD QUE ME BRINDO DURANTE TODO EL DESARROLLO DE LA PRESENTE INVESTIGACION.

A LA M. en C. Martha P. Cruces Martínez Y MI RECONOCIMIENTO POR SU APOYO Y COLABORACION SIEMPRE POFESIONAL EN LA REALIZACION DE ESTA INVESTIGACION.

AL Dr. Victor Manuel Salceda Sacanelles POR SU CONFLANZA, DISPOINIBILIDAD Y COLABORACION EN ESTA TESIS

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini, al Dr. Manuel Uribe Alcocer, a la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, la Dra. Patricia Ramos Morales, la Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque, la Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón y al Dr. Victor Manuel Salceda Sacanelles, POR LA REVISIÓN DE ESTA TESIS.

AL Dr. Louis Levine, POR ESTIMULAR LA REALIZACION DE ESTA INVESTIGACION.

A LA Dra. Judith Guzmán Rincón, A LA M. en C. Olga Olvera Ramírez Y A LA Bióloga Carolina Arceo Maldonado, POR SU COLABORACION EN ESTA INVESTIGACION.

A LA Técnico Dora luz Barrón Manrique, POR SU EXCELENTE COLABORACION TECNICA DURANTE LA PRESENTE INVESTIGACION.

AL Dr. Rafael Villalobos Pietrini Y AL Dr. Manuel Uribe Alcocer, QUIENES FORMARON PARTE DE MI COMITE TUTORIAL, POR SUS RECOMENDACIONES SIEMPRE PROFESIONALES DURANTE LA REALIZACION DE ESTA INVESTIGACION.

AL Dr. Manuel Uribe Alcocer POR PERMITIRME UTILIZAR LAS INSTALACIONES DEL LABORTORIO DE GENETICA DE PESES DEL Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, ASI COMO PROPORCIONARME LAS FACILIDADES PARA ENTRENARME EN LA TECNICA DE ELECTROFORESIS.

A LA M. en C. Matilde Breña Valle POR BRINDARME SU APOYO PARA HACER ESTA INVESTIGACION.

AL M. en C. Tomas Santamaria Preciado POR SU COLABORACION EN EL DISEÑO DE ESTA TESIS.

AL Dr. Stanley Zimmering POR SU RIGOR CIENTIFICO, POR SU
DISPONIBILIDAD Y CONFIANZA. - SOY UNA PERSONA AFORTUNADA POR
CONTAR INCONDICIONALMENTE CON PERSONAS COMO EL-

DEDICO ESTE TRABAJO DE TESIS CON TODO MI CARIÑO Y AMOR

A MI HIJO Alejandro QUE CON SU ALEGRIA Y ENERGIA SIEMPRE ME
ESTIMULA A HACER MAS COSAS Y BIEN.

A MI ESPOSA Martha Patricia POR APOYARME SIEMPRE
INCONDICIONALMENTE.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCION	3
2. ANTECEDENTES	9
2.1. Sistemas para evaluar los efectos de la radiación ambiental	10
2.1.1. <i>Tradescantia</i>	10
2.1.2. <i>Nicotiana y Arabidopsis</i>	11
2.1.3. <i>Drosophila</i>	13
2.2. Contribución de la industria nuclear a la radiación natural de fondo	14
2.3. Radiólisis del agua	15
2.4. Estrés oxidante	18
2.5. Adaptación a las dosis bajas de radiación	21
2.6. Superóxido dismutasa	28
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVO	34
4.1. Objetivos específicos	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1. Sitios de colecta	36
5.2. Establecimiento de isolíneas	37
5.3. Colecta de huevos	37
5.4. fuente de radiación	38
5.5. Electroforesis	38
5.5.1. Soluciones	38
5.5.2. Preparación del gel	39
5.5.3. Preparación de las muestras	39
5.6. Análisis estadístico	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1. Viabilidad huevo-adulto (VHA)	41
6.1.1. Comparación entre especies	42
6.1.2. Comparación entre sitios	43
6.1.3. Comparación entre temporadas	45
6.2. Radiosensibilidad	46
6.2.1. comparación entre especies	46
6.2.2. Comparación entre sitios	47
6.2.3. Comparación entre la etapa pre y operante de los reactores	48
6.2.4. Comparación entre temporadas	51
6.3. Frecuencias alélicas de <i>Sod</i>	52
6.4. Posibles factores contribuyentes a la resistencia a la radiación	56
7. CONCLUSIONES	59
8. REFERENCIAS	60
FOTOGRAFÍAS	66
TABLAS	67

RESUMEN

La generación de electricidad mediante el uso de material nuclear en plantas nucleoelectricas implica un probable incremento en la radiación de fondo natural, mismo que presuntamente puede tener impacto sobre los organismos que habitan en las inmediaciones.

Para identificar y cuantificar ese posible efecto, se analizó por un período de diez años, el comportamiento de las poblaciones naturales de dos especies: *Drosophila melanogaster* y *D. simulans* que habitan en la vecindad de la primera Planta Nucleoelectrica Mexicana. Con este fin se hicieron colectas en dos sitios, uno cerca y otro lejano, dentro de la planta durante la etapa pre y operante de los reactores y se analizaron los siguiente parámetros: (a) la viabilidad huevo-adulto; (b) los efectos de los rayos gamma sobre la viabilidad y (c) las frecuencias génicas de los alelos del gen *Sod* que codifica para la superóxido dismutasa (SOD) enzima que se ha demostrado que contribuye en la adaptabilidad ante la radiación en algunos organismos. Se hicieron 20 colectas de las que se establecieron isolíneas y se analizaron de cada una de las especies y los resultados obtenidos se compararon con respecto a: (a) especie; (b) temporada de lluvias o secas y (c) sitio de colecta.

Los datos obtenidos indican que: (a) la viabilidad huevo-adulto y la radioresistencia de *D. melanogaster* es superior a la de *D. simulans*, en ambos sitios y se hace notar una alternancia con relación a la temporada de lluvias y secas; (b) hay diferencias entre la etapa pre y operante de los reactores favoreciendo en la segunda la resistencia a la radiación de ambas especies cuando consideramos el Sitio II (cercano a los reactores); (c) No se encontraron diferencias entre los sitios con la viabilidad huevo-adulto; con la radiosensibilidad ni con las frecuencias alélicas de *Sod* y (c) las frecuencias de ambos alelos para las dos especies no difieren significativamente entre si. En todos los casos observados se presentó una alta frecuencia de heterocigotos. Según nuestra hipótesis, se requiere un seguimiento periódico a largo plazo para poder detectar el papel adaptativo de este gen en las poblaciones de *Drosophila* de Laguna Verde, Veracruz, México.

Se puede concluir que no hay impacto negativo sobre las poblaciones de *Drosophila* estudiadas. Sin embargo, se encontró que hay una resistencia a la radiación en la etapa operante de los reactores.

ABSTRACT

The generation of electricity from nuclear material in nucleoelectric plants implies a possible increment in background radiation that presumably could have some impact on the organisms that live in the vicinity.

In order to identify and quantify the possible effect, the behavior of natural populations of two sibling species, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*, that live in the immediate vicinity of the first Mexican Nuclear Power Plant, was analyzed for a period of ten years.

For this purpose, collections of flies were made at two sites, one close to and one further from the power plant, during the pre- and operational stages of the reactor. The following parameters were analyzed: (a) egg-to-adult viability, (b) the effects of gamma rays on viability, and (c) allele frequencies of the *Sod* gene which codes for the superoxide dismutase enzyme (SOD), demonstrated to contribute to the adaptability of organisms to irradiation.

Twenty collections were carried out, isofemale lines of each species established

and tested and the results compared with regard to (a) species, (b) rainy or dry season and (c) site of collection.

The data obtained indicate that (a) in both sites, the egg-to-adult viability and radioresistance to gamma radiation was higher in *D. melanogaster* than in *D. simulans*. Further, a relationship was found between egg-to-adult viability and the state of the weather (rainy or dry season); (b) moreover, differences between pre- and operational stages favoring resistance to radiation in the operational stage were found in both species at the second site (that closer to the power plant); (c) no differences were found between the two sites with respect to egg-to-adult viability or radiosensitivity, and (d) no differences were found between sites or between species regarding allelic frequencies of the *Sod* gene, a high frequency of heterozygotes having been found at both sites and in both species. It may be concluded that there is no negative impact on the *Drosophila* populations studied but rather a high radioresistance during the operational stage of the reactor.

1. INTRODUCCION

Para entender las poblaciones es necesario estudiar como ocurren las leyes de Méndel y otros principios genéticos. Tal estudio es esencial para la comprensión apropiada de la evolución debido fundamentalmente, a que ésta es el resultado de los cambios progresivos en la composición genética de una población. Una área de la genética que busca entender y predecir los efectos de los fenómenos genéticos tales como la segregación, la recombinación, la transposición y la mutación es la genética de poblaciones. Al mismo tiempo, toma en consideración tanto los factores ecológicos y evolutivos como el tamaño de población, los patrones de cruzamiento y de distribución geográfica de los individuos, la migración y la selección natural. La mayoría de los factores evolutivos y ecológicos que influyen en las poblaciones también interactúan unos sobre otros. Para comprender esta complejidad de interacciones son necesarias una variedad de aproximaciones que incluyen la construcción de modelos teóricos, observaciones descriptivas cuidadosas y la interpretación de patrones estadísticos tanto como el desarrollo controlado de experimentos.

Uno de los factores ecológicos que influyen sobre la evolución y destino de las poblaciones son las radiaciones ambientales. A lo largo de la historia, todos los individuos se han expuesto a la radiación ionizante de bajo nivel procedente de fuentes naturales, la que puede incrementarse por la emanación de radiación proveniente de fuentes creadas por el hombre, sobre todo aquéllas de índole médica que aumentan el riesgo de generar alteraciones genéticas y/o tumores. No obstante, se desconoce cual es el grado exacto de peligrosidad que presenta la radiación de bajo nivel que emana del medio y de las fuentes artificiales. Los estudios para dar respuesta que han implicado muchos años de investigación, no han arrojado resultados que demuestren su peligrosidad y que, en caso de ser real, comparado con otros riesgos a los que nos hallamos expuestos en el quehacer diario demuestra que la amenaza global de la radiación ionizante de bajo nivel no debería constituir motivo alguno de preocupación.

Otro aspecto relacionado con la radiación ambiental, es el problema de los umbrales ya que no se sabe si el efecto que producen las radiaciones ionizantes a niveles bajos, es siempre el resultado de la acumulación o si éstos sólo se manifiestan cuando

sobrepasan determinado valor umbral. La situación de que cualquier cantidad de radiación produce efecto y la expresión de este se encuentre relacionada con la probabilidad y sea a menor dosis, para que se detecte el efecto se requiere un aumento en el tamaño de la población expuesta en donde las pruebas que pueden resolver estas incógnitas se tornan cada vez más complejas.

Aunque ya muy pocos defienden la existencia de un umbral, que al ser sobrepasado podría provocar la inducción de tumores, todavía las agencias reguladoras ponen límites a la exposición de radiación ionizante debido a que continúa sin conocerse el alcance de los efectos asignables a las dosis bajas de radiación.

En términos generales la radiación ambiental de fondo que existe en la naturaleza contribuye con bajas dosis y está constituida principalmente por rayos cósmicos; emisiones procedentes de las desintegraciones de uranio (U^{235}), torio (To), radio (Ra) y demás elementos radiactivos de la corteza terrestre; emisiones de potasio 40 (K^{40}), carbono 14 (C^{14}) y otros isótopos radiactivos que se encuentran en el organismo. La dosis promedio

colectiva, procedente de estas tres fuentes recibida por los órganos internos de un individuo que viva en un lugar a nivel del mar, está alrededor de los 0.8 milisievert* por año. En zonas de mayor altitud, donde la radiación cósmica es más intensa, o en regiones donde el contenido en radio es superior, podrán recibir dosis mayores (Upton 1982) inclusive del doble de la permitida.

La fracción radiactiva más importante de las fuentes artificiales o creadas por el hombre es la constituida por su uso en el diagnóstico médico, cuyo valor se aproxima al causado por el fondo natural. Otras fuentes que se reconocen como debidas a la actividad humana son los minerales radiactivos presentes de forma natural en ciertos tipos de piedra prensada que se utilizan como materiales de construcción y abonos fosfatados, componentes radioemisores de los aparatos de televisión, detectores de humo y otros productos de consumo y por supuesto la lluvia radiactiva de explosiones nucleares y escapes de centrales nucleares generadoras de electricidad.

* Sievert (Sv) Nombre de la unidad de dosis equivalente o dosis absorbida ponderada en términos del potencial dañino de la radiación que la produce. Un Sievert equivale asimismo a un julio por kilogramo.

Los efectos cancerígenos y los trastornos hereditarios constituyen dos aspectos principales que han estimulado numerosas investigaciones relacionadas con las dosis bajas de radiación. Para determinar qué riesgos o beneficios tienen éstas, merece una consideración más pormenorizada de las interacciones entre la radiación ionizante y la célula viva.

A medida que va penetrando en el tejido, la radiación ionizante libera su energía a través de una serie de colisiones e interacciones aleatorias con los átomos y moléculas que le salen al paso dando lugar a la aparición de iones y de radicales reactivos; éstos son capaces de romper enlaces químicos y causar otras alteraciones en las moléculas vecinas. La distribución de las ionizaciones a lo largo del trayecto del rayo o la partícula depende de la energía, de la masa y de la carga eléctrica de la radiación y en menor grado, de la densidad del tejido expuesto.

La acción mutagénica de la radiación sobre el material hereditario ha sido objeto de extensas investigaciones en múltiples especies desde que H.J. Müller la descubriera en *Drosophila* en 1927. Por ejemplo, de los experimentos realizados con roedores, se ha inferido que la inducción de

mutaciones por radiación de baja transferencia lineal de energía como los rayos gamma en espermatogonias y ovocitos, tiene una relación dependiente de la dosis (entendiéndose por dosis a la cantidad total de energía depositada en un tejido o célula sin considerar el tiempo y tasa a la cantidad de energía depositada por unidad de tiempo) y que con la radiación de alta transferencia como la de protones, neutrones y alfa, la tasa de mutación crece de un modo muy pronunciado con relación a la dosis, pero es independiente a la tasa con que se administra. Con la radiación de baja transferencia, la frecuencia de mutaciones no aumenta tan drásticamente en función de la dosis, pero se muestra muy ligada al ritmo de la dosis. Cuando se abordan estos temas resulta interesante dirigir la atención hacia los efectos genéticos producidos por las explosiones nucleares. Después de los estallidos de las bombas atómicas en Hiroshima y Nagasaki, el estudio de los efectos de las radiaciones sobre las poblaciones fue motivo de numerosos estudios con diferentes sistemas que incluyen a *Drosophila*. Es el caso del efecto de la exposición crónica a las radiaciones sobre la viabilidad huevo-adulto, en las que se incluyen la inducción por radiación de letales recesivos y el

análisis de su efecto sobre la viabilidad de *D. melanogaster* (Oregon-R) en condición heterocigótica (Wallace 1956) o la exposición a dosis agudas en cada generación bajo condiciones relajadas o severas de selección (Sankaranarayanan 1965, Ayala 1966, Blaylock y Shugart 1972), la variabilidad en la sensibilidad a la radiación de isolíneas (Parsons *et al.* 1969), o el estudio de enzimas relacionadas con el efecto protector contra los efectos de la radiación como es el caso de la superóxido dismutasa (Peng *et al.* 1986, Hudson *et al.* 1994, Yamaoka *et al.* 1994). No obstante, en su mayoría los resultados de los estudios citados anteriormente fueron el producto de exposiciones a dosis altas de radiación.

En los humanos, no se ha detectado ningún aumento apreciable en el número de las anomalías genéticas en los descendientes de quienes sobrevivieron a los dos bombardeos atómicos. Ello es compatible con la tasa de inducción observada en los roedores, toda vez que el tamaño de la muestra de 78,000 niños fue muy pequeño y la dosis media de 0.5 Sieverts, recibida por las gónadas de los padres fue baja (Upton 1982).

Estas observaciones han dado la pauta para explorar el campo de los efectos de las dosis bajas ya que por lógica se esperaría

que éstas también tuvieran algún impacto sobre las células y los individuos que las reciben. En este sentido se han realizado una cantidad importante de investigaciones por un largo período, enfocadas al estudio de la acción mutagénica y modificadora de la estructura celular por agentes tales como los rayos-X. Posteriormente, el énfasis de las investigaciones se cambió para estudiar a las mutaciones como un proceso celular en el que las lesiones primarias son modificadas sustancialmente por un sistema enzimático de reparación del ADN como parte constitutiva de la célula (Auerbach 1976). Finalmente, se ha mostrado considerable interés en las funciones celulares inducibles que incluyen la posible activación de la reparación al ADN por el daño ocurrido en la célula después de la exposición a dosis muy bajas de mutágenos posiblemente a través de las lesiones causadas al ADN. Los procesos inducibles por el daño al ADN son probablemente parte de una clase de fenómeno biológico en que las células y los organismos responden a diferentes tipos de estrés. Cuando éste es provocado por un agente mutagénico físico o químico, una de las respuestas más interesantes es que los individuos se adaptan.

En los estudios cuyo enfoque principal es analizar los efectos genéticos de las dosis bajas de radiación, se ha demostrado que cuando los organismos son sometidos a niveles por debajo de 30 cGy (Joiner *et al.* 1996) son capaces de responder reduciendo con mayor eficiencia el daño al ADN inducido por una dosis mayor subsecuente. Esta respuesta fue descubierta por primera vez en bacterias por Samson y Cairns (1977) conocida como respuesta adaptativa. Las evidencias experimentales demuestran ampliamente su existencia en sistemas eucariotes, como en levaduras (Godon *et al.* 1998) en células de mamíferos (Samson y Schwartz 1980) y de plantas (Magnien *et al.* 1981), en *Drosophila* (Fritz y Shaeppi 1991, Schappi 1994), en mamíferos (Cai y Liu 1990) y en plantas (Rieger *et al.* 1982, Heindorff *et al.* 1987, Rieger y Michaelis 1993). Los mecanismos subyacentes de este fenómeno están razonablemente conocidos en procariotes. No obstante, aún no se describen mecanismos de regulación en eucariotes.

Las investigaciones anteriores fueron encaminadas primero a entender la biología celular y segundo para conocer si las dosis bajas son capaces de inducir mecanismos que reduzcan el daño citogenético y como consecuencia, probablemente disminuir el

cáncer. Los estudios incluyen el controvertido concepto de la hormesis o efectos benéficos de la radiación en el que las evidencias carecen de sustento estadístico que defiendan claramente este efecto y la tan ampliamente estudiada respuesta adaptativa. Ambos campos, se refieren a las consecuencias positivas que se pueden desarrollar en los individuos que se exponen a dosis bajas. Un aspecto que carece prácticamente de sustento experimental es el relacionado con los presuntos impactos que tienen las alteraciones de los niveles de radiación de fondo sobre poblaciones naturales que en teoría podrían modificar a largo plazo sus valores adaptativos originales. Se ha observado que la frecuencia de algunos arreglos cromosómicos en las poblaciones naturales de *D. pseudoobscura* cambia durante el transcurso de un año (Dobzhansky 1971). Una de las posibles explicaciones es que la eficacia biológica de los arreglos cromosómicos sea debida a cambios estacionales. Otro ejemplo es el del melanismo industrial observado en *Biston betularia* que ha tenido una considerable evolución en los últimos doscientos años. En aquellas localidades las formas melánicas han reemplazado totalmente a las típicas polillas de color

grisáceo. Gran variedad de pruebas han corroborado la hipótesis de que la evolución de las melánicas es debida a cambios en la eficacia biológica asociados con la contaminación industrial del ambiente. La adaptación en cuestión ha sido identificada como la coloración críptica de las oscuras que tienen mayor probabilidad de escapar de la depredación que las polillas claras cuando reposan en los árboles ennegrecidos.

El estudio de las poblaciones naturales que habitan en ambientes que han sido alterados, es un recurso que puede proporcionar información relevante particularmente si se consideran como un sistema de advertencia oportuna basado en sus respuestas biológicas al daño celular en niveles de organización molecular, subcelular o celular (Moore *et al.* 1986). La presente investigación pone particular énfasis en el uso de *Drosophila* como organismo centinela para evaluar los efectos de los presuntos incrementos de la radiación de fondo provocado por el funcionamiento de los reactores de la Central Nucleoeléctrica de Laguna Verde.

En este sentido, desde 1986 se inició un estudio de largo plazo utilizando como indicadores biológicos a dos especies de *Drosophila*, que habitan en el área de la

Central cuya información obtenida, será útil entre otros aspectos, para informar a la opinión pública sobre cual ha sido el impacto –si este ocurre– de la planta sobre las poblaciones estudiadas. La importancia de este análisis radica: a) en que contribuirá en el conocimiento de los efectos a largo plazo de los niveles bajos de radiación sobre las poblaciones naturales, b) por ser el primero en su tipo, proporcionará datos originales sobre un posible indicador biológico para otras investigaciones semejantes ya que en la actualidad no se conoce aún el bioindicador “ideal” y c) que concluida la vida útil de la Central, la información permitirá efectuar estimaciones del impacto ecológico que su operación pueda tener sobre dichas poblaciones.

2. ANTECEDENTES

Esta investigación consiste en estudiar a largo plazo algunas características de valor adaptativo utilizando a dos especies fraternas, *D. melanogaster* y *D. simulans* que habitan en el área de la primera Planta Nucleoeléctrica Mexicana, ubicada en Laguna Verde, Veracruz. Los muestreos se iniciaron desde la etapa de su construcción con el objeto de obtener datos previos que permitieran hacer comparaciones con la etapa operante. El estudio incluye el análisis de factores que son determinados genéticamente y que pueden ser afectados por incremento de los niveles de radiación de fondo producidos por el funcionamiento de la planta, tales como la viabilidad huevo adulto (VHA), las frecuencias alélicas del locus SOD y la radiosensibilidad. Esta última, en el caso de traducirse en radioresistencia, de acuerdo a la literatura, es el resultado del mismo efecto que provoca la dosis acondicionante en la respuesta adaptativa (Joiner *et al.* 1996).

D. melanogaster y *D. simulans* han sido objeto de varios estudios que han tenido como finalidad determinar hasta qué punto las semejanzas morfológicas que existen entre ellas se reflejan en su bioquímica (Hubby y Throckmorton 1968), longevidad

(Schnebel y Grossfield 1983), fisiología (Mckenzie y Parsons 1974), comportamiento (Hoffmann 1987) y estructura genética (Choudhary y Singh 1987). Las conclusiones de estos trabajos muestran que las diferencias son importantes en el equilibrio que se mantiene entre ambas, en la naturaleza.

La razón de utilizar dos especies en la presente investigación es la de valorar la respuesta de cada una al presunto impacto y determinar si éste ocurre de igual manera en ambas, además de evaluar si se provocan cambios biológicos a largo plazo. Para tal efecto, los indicadores biológicos permiten estimar el impacto ocurrido en poblaciones (Hellawell 1991) y considerar directamente los efectos que sobre los organismos pueda tener el funcionamiento de centrales de este tipo.

Es claro que hay mucho por hacer para alcanzar a comprender las consecuencias biológicas de la gran cantidad de agentes químicos y físicos que puedan concurrir en un entorno particular, las que además pueden llegar a hacerse más complejas por la presencia de otros factores bióticos y abióticos que interactúan entre sí, o de aquellos que pueden modificar las funciones de los organismos tales como

temperatura o humedad. No obstante, los denominados indicadores biológicos representan una opción para estimar tales consecuencias biológicas registrando varios aspectos de la contaminación entre los que destacan: 1. La acumulación de los contaminantes en forma integrada que adicionalmente conlleva a hacer suposiciones acerca de la disponibilidad biológica de los mismos y 2. La cuantificación del impacto producido, mediante pruebas específicas.

Basados en el segundo aspecto se evaluó el impacto ecológico mediante el análisis de la viabilidad huevo adulto, la radiosensibilidad y las frecuencias alélicas del locus *Sod* para estudiar directamente los efectos que pueda tener el funcionamiento de la Central, específicamente lo relacionado con las presuntas emisiones radiactivas sobre *Drosophila*. Sin embargo, vale la pena mencionar que hay otros sistemas que se han usado para tales fines, por lo que en la siguiente sección se describen algunos que se han utilizado como dosímetros biológicos y para estimar el riesgo en Centrales Nucleares y en zonas habitadas pero contaminadas por elementos radiactivos.

2.1. Sistemas para evaluar los efectos de la radiación ambiental

Debido a que el cálculo de la contribución al incremento de la radiación de fondo del funcionamiento de centrales nucleares es del orden de 0.001 mSv, por unidad de tiempo (CNS 1987) y que las emisiones líquidas y gaseosas de la Central Laguna Verde, 1989-1994 son radioiológicamente muy bajas (el informe radiológico indicó que están dentro del límite permitido, siendo la emisión más alta reportada de 23.3% del máximo aceptable, 1.5 mrad), vale la pena describir brevemente algunos de los monitores biológicos que han sido utilizados para detectar la presencia de niveles bajos de radiación ambiental como es el caso de *Tradescantia*, *Nicotiana* y como indicador biológico centinela para estudios a largo plazo a *Drosophila*.

2.1.1. *Tradescantia*

Uno de los sistemas de prueba que presenta sensibilidad elevada, es el de los pelos estaminales de *Tradescantia*. Se ha demostrado que algunos clones específicos de esta planta son un sistema de prueba botánico muy eficiente para estudiar los efectos genéticos de mutágenos físicos y químicos (Sparrow *et al.* 1974, Takahashi e Ichikawa 1976). Estos clones son todos

heterocigotos para el color de las flores y los pelos estaminales (azul / rosa; donde el color azul es el dominante). Las características del sistema son la detección sencilla de todas las células mutantes rosas sin confundirlas con otras células así como la relativa facilidad de manipular un gran número de muestras, y sobre todo que ha demostrado su capacidad para detección de los efectos genéticos de los niveles bajos de radiación. Así se ha probado que la frecuencia de las mutaciones rosas en los pelos estaminales tiene una relación lineal con la exposición crónica a radiación gamma menor de 0.72 R. Sparrow *et al.* (1972) verificó igualmente que las frecuencias de las mutaciones somáticas rosas en los pelos estaminales de *Tradescantia* se incrementan linealmente con relación a la dosis agudas de rayos-X en rangos de dosis extremadamente pequeños de 0.25 a 6 rads. De acuerdo con ellos la frecuencia de mutación se eleva con niveles altos de radiación natural de fondo y con radionuclidos antropogénicos de niveles bajos. Con la curva dosis respuesta de las mutaciones somáticas rosas se confirmó que es lineal no sólo en rangos de dosis pequeñas sino también a tasas de exposición bajas (Ichikawa 1981).

El sistema está basado en la estimación de la cantidad de pelos estaminales derivados de eventos de mutación puestos en evidencia por la aparición de las células rosas de cada pelo estaminal. Una dos o más células rosas juntas; dos o más pelos contiguos completamente rosas o una fila de células rosas separado por una célula azul, se consideran como derivadas de un sólo evento mutacional, tomando en cuenta que puede ocurrir entrecruzamiento somático. La frecuencia de mutaciones rosas se expresa como el número de eventos de mutaciones rosas por cada 1000 pelos analizados (Ichikawa 1981).

2.1.2. *Nicotiana* y *Arabidopsis*

Otros sistemas que se han usado para hacer biomonitoreo en zonas contaminadas con radiación y han demostrado sensibilidad a las dosis bajas de radiación crónica emanada de suelos contaminados son las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* para un gen que codifica para la β -glucoronidasa por recombinación homóloga (Swoboda *et al.* 1994 y Kovalchuk *et al.* 1998). Estos sistemas fueron desarrollados, para determinar la genotoxicidad de los suelos contaminados con radionúclidos en las

áreas habitadas de Ucrania (Kovalchuk *et al.* 1999).

Las plantas de *A. thaliana* y *N. tabacum* se transformaron con un marcador de recombinación que consiste de dos delecciones traslapadas no funcionales que confirman deficiencia en el gen de la β -glucoronidasa y que comparten 566 pares de bases homólogas. El sistema consiste básicamente en que las plantas transgénicas restauran la función del gen de la β -glucoronidasa mediante eventos de recombinación. Esta actividad se hace evidente porque las hojas de las plantas muestran sectores azules que se vuelven blancas después de teñirlas histoquímicamente (Swoboda *et al.* 1994, Puchta *et al.* 1995). Lo anterior está fundamentado en que la radiación ionizante produce rompimientos de banda simple o dobles en el ADN, que pueden ser reparados por recombinación homóloga. La frecuencia de recombinación se obtiene contando los eventos ocurridos por este mecanismo que se identifica como sectores en las hojas de cada planta por separado, se suman y se relacionan estos datos con el número de plantas en la población. Este ensayo fue previamente utilizado para estudiar el efecto de la irradiación crónica

proveniente de suelos contaminados severamente alrededor de la central de Chernobyl. Se demostraron la sensibilidad y la confiabilidad del bioensayo a la contaminación nuclear en un rango de 1 a 40 Ci / km² (Kovalchuk 1999). Una observación relevante fue que el incremento significativo en la recombinación homóloga era dependiente de la dosis en las plantas que fueron cultivadas en la zonas afectadas y que se hayan habitadas, demostrando la alta y persistente genotoxicidad de los suelos contaminados con materiales radioactivos.

Otra técnica que ha sido utilizada para los mismos fines es la del cultivo de protoplastos de especies de *N. sylvestris* introducida por Bourgin *et al.* (1979) y Nagy y Maliga (1976). Este sistema ha sido empleado por diversos investigadores para estudios de genética. También se ha usado a *N. plumbaginifolia* para hacer estudios de radiobiología debido a su alta sensibilidad a bajas dosis de radiación así como a la homogeneidad observada en su respuesta, comparable con sistemas animales (Magnien *et al.* 1981).

No obstante, de la existencia de los sistemas mencionados, para el objetivo del presente estudio, es importante utilizar un

sistema que tenga hábitos parecidos a los del hombre por ejemplo, aquellos relacionados con la capacidad de desplazamiento, por todo lo que esta característica implica para poder extrapolar los resultados. El sistema que ofrece estas ventajas es el de *Drosophila*.

2.1.3. *Drosophila*

Es uno de los organismos estudiados más ampliamente en biología y sirve como un sistema modelo para la investigación de muchos procesos celulares y de desarrollo comunes en eucariotes superiores incluyendo al humano.

Aunque el genoma humano es mucho más complejo es muy parecido al de la mosca de la fruta ya que comparten muchos genes y rutas bioquímicas del metabolismo (Asdams *et al.* 2000) por lo que es un organismo muy útil para hacer estudios de genética de poblaciones, biología molecular, comportamiento, fisiología y mutagénesis, entre otros. Esta versatilidad del sistema, además, se debe a que presenta varias ventajas, entre las que destacan: 1) ciclo de vida relativamente corto, de 10 días en condiciones de laboratorio (a 25° C y 60 % de humedad relativa); 2) durante su desarrollo pasa por varios estados esto es, sufre metamorfosis completa (huevo, larva,

pupa y adulto) lo cual ofrece la posibilidad de utilizar cualquiera de ellos y garantiza un espectro amplio de exposición de individuos provenientes de la naturaleza; 3) la posibilidad de analizar varias generaciones en un período breve; 4) la relativa facilidad de analizar organismos colectados directamente de la naturaleza; 5) tiene hábitos parecidos a los del hombre; 6) su genoma está ampliamente estudiado, y por supuesto; 7) el bajo costo del sistema, entre otras.

La secuenciación del genoma de la mosca de la fruta junto con el conocimiento de su biología, proporcionan elementos invaluable para dar inicio a una nueva etapa en la que se desarrollen estudios aún más sofisticados de genética. El genoma de *Drosophila* contiene muchos genes homólogos relacionados con enfermedades en los humanos que no se conocían. Estos últimos hallazgos sugieren que *Drosophila* puede ser aún más útil de lo que se consideraba, para estudiar los procesos celulares y moleculares fundamentales en los padecimientos humanos tales como el cáncer (Asdams *et al.* 2000).

2.2. Contribución de la industria nuclear a la radiación natural de fondo

El mantenimiento de los reactores en operación, comprende varias actividades, desde las minas y demolición del uranio hasta la fabricación y el almacenaje de combustibles para su uso. En los Estados Unidos de América, por ejemplo están en operación cientos de minas de uranio, aproximadamente veinte demolidoras de uranio y un número similar de plantas de fabricación de combustible en donde se emplean a miles de hombres.

Aunque han existido problemas con la liberación de radionúclidos en la purificación de uranio y que estos se han controlado en forma adecuada, principalmente cuando se trata de liberación al ambiente por parte de plantas nucleares comerciales, la radiación de fondo se incrementa en las zonas aledañas. Tomando en consideración lo anterior la Comisión Reguladora Nuclear de los E.U.A. ha establecido un límite de 8 mrems / año de dosis equivalente (dosis equivalente es la dosis absorbida ponderada en términos de daño potencial de las diferentes radiaciones y su unidad es el Sievert (Sv)) de exposición de cuerpo total para la población en general por liberaciones normales de

plantas nucleares y para órganos del cuerpo tales como la tiroides es de 15 mrems / año. La agencia protectora del ambiente (EPA) estableció que el límite de la dosis equivalente de cuerpo total para la población en general, debidas a fuentes originadas por la industria nuclear es de 25 mrems / año (BEIR Committee, 1980).

En el caso de un accidente nuclear, el estroncio 90 (Sr^{90}) y el cesio 137 (Cs^{137}) son los radionúclidos de mayor importancia en términos de dosis recibida por las poblaciones. Sin embargo, el tritio (H^3), el carbono-14 (C^{14}) y el criptón-85 (Kr^{85}), son radionúclidos muy importantes en términos de contaminación ambiental debido a que se liberan, aunque en mínimas cantidades, durante las operaciones rutinarias de los reactores y aún más por la dificultad de removerlos de las corrientes de aguas y espacios confinados. No obstante, el BEIR (1980) ha estimado para la población de los E.U.A. que la dosis equivalente por persona debida a la liberación de radionúclidos por la industria nuclear es de 1 mrem / año.

Debido a que la radiación ionizante provoca cambios en la estructura de las biomoléculas y que los individuos están constituidos por un porcentaje alto de agua

resulta importante tratar acerca de la radiólisis del agua y la formación de radicales libres.

2.3. Radiólisis del agua

Si el agua es el componente más abundante que existe sobre la tierra y muchos sistemas químicos son soluciones acuosas, es natural que la atención de la química de la radiación sea enfocada particularmente a los efectos de la radiación ionizante sobre el agua. Los radiobiólogos también están interesados en el problema ya que el citoplasma esencialmente es un sistema acuoso. Específicamente las moléculas biológicas importantes pueden ser modificadas no directamente por la radiación sino por sus interacciones con productos derivados de la acción de ésta sobre moléculas solubles (Arena 1971, Riley 1994).

En un principio se refería al agua irradiada como activada debido a que además de liberar hidrógeno y oxígeno parecía ser muy reactiva, debido a que podía inducir fácilmente cambios químicos en ciertos componentes disueltos en ella. Después de varios estudios relacionados con el problema de definir la composición del agua activada ahora se sabe que la radiación

ionizante induce en ella la formación de especies químicas muy reactivas conocidas como especies de oxígeno reactivas (EOR) con naturaleza de iones y de radicales libres como productos secundarios y/o primarios, ambos involucrados en interacciones mutuas o en reacciones con otras moléculas de agua o del soluto que pudieran estar presentes en el sistema (Riley 1994). La probabilidad de una reacción secundaria depende de una variedad de factores tales como la ionización específica del tipo de radiación utilizado y la presencia o ausencia del oxígeno en el sistema (Arena 1971).

Se ha establecido que las partículas ionizantes o los fotones actúan directamente sobre la molécula de agua produciendo radicales libres a través de un posible mecanismo del proceso radiolítico que en términos generales se describe a continuación. Un radical libre es un átomo, molécula o grupo atómico no combinado que lleva un electrón descompensado o no pareado. La descompensación se refiere no sólo al hecho de que el número total de electrones en el radical es un número raro sino que también el giro o spin está descompensado. Los orbitales de electrones no solo giran alrededor del núcleo atómico, sino también alrededor de sus propios ejes

del giro que puede ser en contra o a favor de las manecillas del reloj. En un átomo o molécula con un número dado de electrones, los orbitales están pareados; esto es, cualquier electrón que gira a favor de las manecillas del reloj tiene otro que lo hace en dirección opuesta. Cuando ocurre la descompensación se asocia a un alto grado de alcanzar la estabilidad y por lo tanto de reactividad química, a pesar de que el átomo o molécula esté eléctricamente neutro o cargado (Arena, 1971)

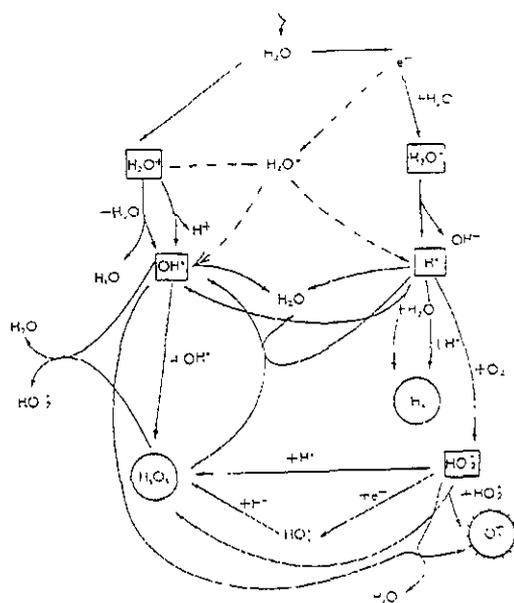


Figura 1. Radiólisis del agua (Arena 1971)

Por ejemplo, en el ión hidroxilo (OH^-) el átomo de oxígeno está rodeado por dos electrones en la órbita K y por 8 electrones en la órbita L. Dos de los 8 electrones se comparten con el átomo de hidrógeno.

formando una unión covalente relativamente fuerte. Uno de los dos electrones compartidos pertenece al átomo de hidrógeno. El sistema total lleva siempre un número de 10 electrones; de esta forma los giros están pareados y el sistema resulta químicamente estable, aunque este es un ión negativo debido a que contiene un total de 9 protones contra 10 electrones, la experiencia dice que el ion hidroxilo es una especie química muy estable (Arena 1971).

Si el ion hidroxilo pierde uno de sus electrones L, el grupo atómico posee un número total de 9 electrones en donde uno no está pareado. Lo que hace a un radical libre, muy reactivo conocido como radical hidroxilo. Este pasa a ser eléctricamente neutro debido a que el número total de protones 9 es igual al número total de electrones. Debido a su alta reactividad química el tiempo de vida de este radical es muy corto, después de su formación puede involucrarse en algunas reacciones químicas y desaparecer como tal. Otros radicales libres pueden tener naturaleza iónica debido a que el total de electrones puede ser mayor o menor que el total de protones. Un radical libre eléctricamente neutro se distingue con un pequeño punto de superíndice en la fórmula química, como por ejemplo OH^\bullet . En cambio los

iones que son también radicales libres no tienen una notación especial; su naturaleza puede ser deducida de la notación electrónica, por ejemplo el H_2O^+ que es un radical libre originado de una molécula de agua que perdió uno de sus electrones externos (Riley 1994).

Se conocen aproximadamente 12 radicales libres que se originan de la radiólisis del agua pura (Arena 1971) de los cuales como ya se mencionó, los más reactivos son el hidroxilo HO^\bullet , el hidrógeno libre H^\bullet , el peróxido de hidrógeno H_2O_2 y el ion superóxido O_2^- . La formación de cada producto depende de la naturaleza de la radiación ionizante utilizada, de las condiciones experimentales durante la irradiación y del grado de pureza del agua.

Los productos finales son formados como resultado de diversos tipos de reacciones, en las que el hidrógeno y el radical hidroxilo desempeñan el papel más importante debido a que son muy reactivos. De acuerdo con la teoría aceptada, estos dos radicales no se originan directamente de la molécula del agua irradiada sino de un ion par H_2O^- y H_2O^+ cuyas reacciones están esquematizadas en la Figura 1.

Por otro lado, el oxígeno molecular es el aceptor más importante de electrones en la biosfera, el que por virtud de su naturaleza bi-radical, tiene la facilidad de aceptar electrones no apareados dando origen parcialmente a la formación de una serie de especies reductoras que son conocidas conjuntamente como especies de oxígeno reactivas (EOR) que incluyen superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^\bullet), peroxilo (ROO^\bullet) y alcoxilo (RO^\bullet), que pueden estar involucrados en procesos de iniciación y propagación de reacción en cadena de radicales libres que potencialmente son dañinos para la célula (Riley 1994).

En los seres vivos han evolucionado los mecanismos para restringir y controlar parcialmente tales procesos, por compartimentalización y/o por defensas capaces de formar radicales libres estables, por ejemplo ácido ascórbico y alfatocoferol y por la evolución de sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, la catalasa y las peroxidasas, que disminuyen la concentración intracelular de los EOR, aunque algunos de éstos resultan del estrés oxidante, del que se tratará posteriormente, exceden la capacidad para aumentar las defensas antioxidantes de los organismos

provocando que algún tejido pueda resultar afectado e involucrado en algún proceso degenerativo.

Las evidencias indican que los EOR están implicados en mecanismos patológicos primarios producto de perturbaciones físicas y químicas en las que la radiación es quizás el principal contribuyente, por ejemplo el radical hidroxilo ataca indiscriminadamente a moléculas vecinas a tasas de difusión controlada. Los mecanismos patológicos son generados directamente por oxidación del agua o indirectamente por la formación de ROS secundarios producto de otra reducción o activación en los procesos metabólicos de la célula. De esta forma el daño secundario por radiación está influenciado por el estatus antioxidante de la célula y el aumento y disponibilidad de la activación de mecanismos de reparación celular. La respuesta biológica a la radiación puede estar modulada por alteraciones que los afectan y en consecuencia provocar daño a la célula. Por ejemplo, los mecanismos que están involucrados en la célula para el flujo de la cadena de electrones son complejos pero aparentemente hay numerosos intercambios que incluyen su transporte a través de semiquinonas y metales de

transición en varias combinaciones (Riley 1994).

Aunque hay acciones benéficas que son ejecutadas por radicales libres derivados del oxígeno, mucho del interés en estas especies está relacionado con su potencial de causar daño celular. Como ya se mencionó, el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) es el más reactivo y por esta razón sus reacciones son más azarosas. Los radicales como el superóxido y peróxido de hidrógeno son relativamente más estables y su importancia, desde el punto de vista de daño celular, está relacionado esencialmente con su potencial para dar origen fundamentalmente a radicales hidroxilo.

El peróxido de hidrógeno formado por la superóxido dismutasa y por las oxidasas flavino-dependientes se descompone por la acción de la catalasa, una hemo-enzima que cataliza la siguiente reacción:



2.4. Estrés oxidante

Se conoce como estrés oxidante al incremento de EOR, generados directamente por oxidación del agua en donde la radiación desempeña un papel

preponderante como inductor o indirectamente como producto de otra reducción o activación en los procesos metabólicos de la célula que en ocasiones exceden la capacidad de la célula para incrementar las defensas antioxidantes de los organismos provocando alteraciones en las biomoléculas incluyendo al ADN.

El estrés oxidante ha recibido atención especial debido a que los EOR, además de ser generados por el metabolismo aeróbico normal, también son producidos por diversos factores ambientales como: la radiación ionizante, la contaminación por gases, la hipoxia, los metales tóxicos, la deficiencia nutricional, el agua, la luz y la temperatura (Riley 1994). No obstante, se sabe también que la célula en condiciones de estrés oxidante recurre a respuestas genómicas que involucran cambios en la expresión de genes cuyo producto proporciona protección, disminuyendo los EOR del ambiente hostil (Patra *et al.* 1997)

En este sentido, particularmente en *Escherichia coli* se ha demostrado que el mecanismo de protección es operado por dos diferentes regulones, llamados oxyR y soxR disparados por H_2O_2 y O_2^- , respectivamente (Demple 1991), pero el más conocido es el que controla el gen

oxyR. El producto de este gen regula positivamente la transcripción de nueve proteínas como la catalasa y la alquil hidroperóxido reductasa. Por ejemplo, el paraquat un agente oxidante que puede ser convertido por SOD a H_2O_2 (Fridovich 1983) en *E. coli* induce aproximadamente 40 proteínas en las que se incluye la MnSOD; la endonucleasa IV, enzima reparadora de ADN, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una sustancia reductora del paraquat.

En general, hay sistemas enzimáticos que son importantes en la protección celular, como la superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD), la catalasa (Cat) y la glutatión peroxidasa, que son un grupo de enzimas conocidas como hemoenzimas o metaloproteínas que convierten al radical superóxido en agua oxigenada. Hay un segundo sistema antioxidante celular, formado por la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. La primera es una enzima citosólica que con la participación de dos moléculas de glutatión reducido (GSH) transforma el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua. Los peróxidos de lípidos son reducidos en presencia de glutatión. La acción protectora de la SOD y la Cat esta probablemente favorecida por el ácido ascórbico y la vitamina E que aceptan

fácilmente electrones y pueden ejecutar una función de apoyo eliminando radicales libres (Lehninger 1982).

Normalmente los superóxidos son transformados rápidamente en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2) por la acción combinada de la superóxido dismutasa y un metal de transición (Dempfle 1991). El H_2O_2 resultante es prácticamente inofensivo para las biomoléculas, pero cuando reacciona con metales como el hierro o cobre libera radicales OH que son sumamente reactivos y pueden actuar sobre lípidos, proteínas, membranas o cualquier componente de la molécula del ADN (Meneghini *et al.* 1993).

Christman *et al.* (1985) describieron un tipo de respuesta adaptativa por medio de la cual las bacterias adquieren resistencia a dosis letales de H_2O_2 si previamente se exponían a concentraciones bajas de este compuesto. Además notaron que el fenómeno iba acompañado de un aumento en los niveles de varias proteínas. Lo mismo ocurrió con *Sacharomyces cerevisiae*: en condiciones de estrés por H_2O_2 , se analizó el total de proteínas de la célula por electroforesis en gel bidimensional comparada y se encontró que al menos 115 fueron estimuladas por la exposición, pero otras 52 fueron reprimidas. Se desconoce la función de ambos grupos

de proteínas en el mecanismo adaptativo. La respuesta disparada por H_2O_2 incluyó un número importante de proteínas de choque térmico y proteínas que utilizan el oxígeno reactivo como intermediario dada su actividad captadora. También se observó que el proceso biosintético de proteínas disminuía lentamente y que se estimulaban las rutas de degradación de proteínas (Godon 1998).

Se ha observado que el estrés oxidante por H_2O_2 en eucariotes también induce enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, así como pequeñas moléculas tales como glutatión, alfatocoferol y ácido ascórbico que atrapan especies reactivas de oxígeno antes que causen daño al ADN (Gille y Sigler 1995, Fridovich 1983, 1995, Hassan y Scandalios 1990). No obstante, hasta ahora no se conoce en eucariotes un mecanismo claro a la respuesta al estrés oxidante (Patra *et al.* 1997). Parece haber varios sistemas de regulación involucrados que inductivamente podrían ser parecidos al ya mencionado oxyR.

En la actualidad hay suficientes evidencias que indican la existencia de un fenómeno que subyace a la respuesta adaptativa, específicamente el relacionado con la

exposición a bajas dosis de radiación y que involucra mecanismos que en conjunto son conocidos como radioprotección, o respuesta al estrés oxidante y que son regulados por pequeñas dosis de radiación ionizante y otros agentes que dañan al ADN.

2.5. Adaptación a las dosis bajas de radiación

Se considera que hay dos rutas por las que estos mecanismos de radioprotección o respuesta al estrés oxidante inducibles operan: primero, una pequeña dosis acondicionante, generalmente menor a 30 cGy (1 cGy = 1 rad) puede proteger de una exposición subsecuente a radiación mayor llamado respuesta adaptativa. Y segundo, la respuesta a dosis únicas puede ser por si misma dosis dependiente, es decir que pequeñas exposiciones agudas de radiación o dosis a tasas muy bajas pueden ser más efectivas por unidad de dosis que exposiciones mayores arriba del umbral donde se dispara la radioprotección inducida. A estas combinaciones se les ha llamado hipersensibilidad por baja dosis (HRS) que induce radioresistencia (IRR) a dosis superiores subsecuentes. Ambas, la respuesta adaptativa y HRS/IRR, están bien documentadas en estudios con levaduras.

bacterias, protozoarios, algas, células de plantas superiores, células de insectos y mamíferos y células de humano *in vitro* y en estudios sobre modelos animales *in vivo* (Joiner *et al.* 1996). Hay evidencias indirectas que indican que el fenómeno de la HRS/IRR en respuesta a dosis únicas es una manifestación del mismo que subyace a la respuesta adaptativa en el caso de las dos dosis y que puede ser disparada por radiaciones de transferencia lineal de energía (TLE) alta y baja así como por una variedad de otros agentes inductores de estrés tales como peróxido de hidrógeno y agentes quimioterapéuticos. Se sabe poco acerca de la naturaleza de este mecanismo, pero por supuesto hay evidencias de que opera incrementando la cantidad y la tasa de reparación del ADN indirectamente por mecanismos en la modulación de la progresión del ciclo celular o apoptosis; por cambios en la expresión de algunos genes en respuesta a bajas y no a dosis altas que pueden ocurrir en pocas horas después de la irradiación lo suficientemente rápida como para explicar el fenómeno de radioresistencia inducida. No obstante, sus componentes moleculares específicos aún están siendo identificados.

Los primeros experimentos que se hicieron para demostrar que dosis muy bajas de

radiación ionizante y de agentes químicos pueden inducir mecanismos por los que las células se capacitan para responder a subsecuentes exposiciones a dosis altas, fueron realizados con cultivos de linfocitos humanos utilizando como referencia la inducción de aberraciones cromosómicas. Se encontró que en las células que se expusieron a dosis muy bajas (1 cGy) de rayos X y subsecuentemente se trataron con dosis relativamente altas (1 Gy), los rompimientos cromosómicos inducidos se redujeron aproximadamente a la mitad (Wolff 1998).

Se ha demostrado con otros experimentos que esta respuesta adaptativa a dosis bajas, requiere de cierta dosis mínima antes de que sea activada, que ocurre sólo dentro de un pequeño rango de dosis, que es dependiente de la dosis y de la constitución genética de los organismos expuestos. Se evidenció también que la respuesta a la preexposición a dosis bajas no es instantánea sino que toma aproximadamente de 4 a 6 h para activarse completamente (Shadley *et al.* 1987) y puede ser bloqueada cuando en este período la síntesis de proteínas es inhibido (Youngblom *et al.* 1989). La adaptación provocada por dosis bajas de radiación fue atribuida a la inducción de nuevos mecanismos de reparación de los

rompimientos cromosómicos que si se activan en el tiempo del reto con dosis altas permiten a la célula disminuir el daño residual. Esta hipótesis fue fortalecida por experimentos en los que se encontró que los inhibidores de los poli(ADP-ribosa)polimerasa, una enzima implicada en la reunión de rompimientos de cadena del ADN impiden la respuesta adaptativa (Wiencke *et al.* 1986, Shadley y Wolff 1987).

Aunque el fenómeno está bien establecido en la síntesis celular, no se sabe si tendrá alguna utilidad en la estimación del riesgo de la radiación ionizante en humanos. Se están realizando investigaciones novedosas relacionadas con los estudios sobre el mecanismo fundamental para determinar si el efecto puede por sí sólo manifestarse como una disminución en el número de cánceres y en la mortalidad inducida por radiación (UNSCEAR 1994).

Los experimentos realizados con enzimas de restricción, indicaron que los rompimientos dobles de cadena en el ADN pueden accionar eventos de adaptación. Más aún, algunos experimentos preliminares sobre la sobrevivencia de ratones irradiados a cuerpo total, han demostrado que exposiciones múltiples a

dosis de adaptación pueden tener profundos efectos en la supervivencia y que la adaptación puede afectar la frecuencia inducida de linfoma de timo en ratones irradiados. Los experimentos iniciales sobre la respuesta adaptativa han incrementado los esfuerzos en el mundo para entender los mecanismos básicos que están detrás de esto (Wolff 1998).

Una de las evidencias más fuertes de la reparación inducible, proviene de la cuantificación de la reactivación del adenovirus V por los mecanismos de reparación al ADN de una célula hospedera de mamífero. Si la célula hospedero es pretratada con pequeñas dosis que provocan daño leve al ADN suficiente para inducir mecanismos de reparación, se puede observar que incrementan la habilidad para reactivar virus dañados comparándola con células hospedero no pretratadas. Esta aparente reparación inducida también se observó en células acondicionadas con luz UV, con rayos gamma y con agentes químicos (Jeeves y Rainbow 1983). Más aún el mutante *rad52* de *Sacharomyces cerevisiae* deficiente en reparación por recombinación no manifestó respuesta adaptativa después del acondicionamiento (Mitchel y Morrison 1987). En contraste, la línea EM9 deficiente en reparación de

rupturas de hebra sencilla sí presentó hipersensibilidad a dosis bajas y radioresistencia inducida. Los estudios con células V79 y linfocitos humanos indicaron que pequeñas dosis condicionantes de rayos-X ó peróxido provocan que la reunión de rupturas de doble hebra sea muy rápida y completa después de una dosis de radiación de reto aplicada varias horas más tarde (Ikushima 1995). Esto sugiere que el fenómeno dual de hipersensibilidad a bajas dosis y radioresistencia inducida a dosis altas (HRS/IRR) podría estar ligada a rupturas de doble banda y mecanismos de reparación.

Otra hipótesis es que el retraso del ciclo celular esté involucrado en la respuesta debido a que la radiación provoca retraso en la división celular se podría decir inductivamente que puede permitir un tiempo mayor para la reparación del daño genético. Sin embargo, las evidencias con diferentes líneas celulares no han demostrado una correlación consistente entre HRS/IRR y la demora en el ciclo respecto a la dosis. Por medio de estudios con células de mamíferos, se ha encontrado que a niveles similares de muerte celular, las radiaciones con alta transferencia lineal de energía (TLE) son menos eficientes para inducir radioresistencia que los rayos-X

(Lambin *et al.* 1993, Marples *et al.* 1994). En bacterias las dosis acondicionantes pequeñas de neutrones son menos eficientes que los rayos-X para inducir protección y la hipoxia reduce la eficiencia de la dosis acondicionante (Boreham y Mitchel 1991) por lo que se describe que el daño por radicales libres y la radiación con baja transferencia lineal de energía son buenos inductores de la respuesta apoyándose en que se requieren muy bajas dosis para inducir mecanismos que proporcionan radioprotección (Wolff *et al.* 1991, Wolff 1992).

Tanto pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno como de rayos-X, pueden inducir protección en contra de una dosis alta subsecuente de radiación. Aún cuando no se ha encontrado evidencia experimental en eucariotes que confirmen cambios en la expresión genética después de la irradiación preparatoria, se sabe que un gen que es regulado corriente hacia abajo positivamente, después de una hora de recibir 0.2 Gy de radiación, su producto alcanza niveles mínimos pero regresa a las cantidades normales después de 8 h. Estos resultados son similares a las dosis y escala de tiempo de la respuesta adaptativa.

La adaptación inducida por dosis bajas de radiación fue atribuida a la producción de un nuevo y eficiente mecanismo de reparación de rompimientos cromosómicos que está presente en el tiempo del reto con altas dosis de radiación (Olivieri *et al.* 1984, Wiencke *et al.* 1986). Lo anterior se consolidó con experimentos en los que se encontró que la 3-aminobenzamida, un inhibidor de la poli(ADP-ribosa)polimerasa implicada en la reunión de rompimientos dobles de ADN, impide la respuesta adaptativa (Wiencke *et al.* 1986, Shadley y Wolff, 1987). Lo anterior ocurrió inclusive cuando fue administrado después de la dosis de reto pero antes de inducir la reunión de los rompimientos cromosómicos e indicó que la disminución fue causada no por un cambio en la sensibilidad inicial de la célula sino por un fenómeno estimulado después, tal como el de reparación. Se ha visto que la 3-aminobenzamida también bloquea el desarrollo de IRR en células V79 (Marples y Joiner 1995).

Entre los numerosos esfuerzos realizados para tener métodos adecuados para tratar de identificar los procesos moleculares involucrados en la reparación manifestada como adaptación, Meyers *et al.* (1992) y Boothman *et al.* (1992) han notado

cambios en el nivel de la transcripción de genes después de la exposición a la radiación ionizante. Wolff (1998) expuso linfocitos humanos a una dosis de adaptación de 2 cGy de rayos X y verificó utilizando un grupo de sondas para transcribir fragmentos de ARNs a cADNs, que las células irradiadas tenían algunos mARNs que no se presentaron en las células no irradiadas y viceversa. Más aún, algunos cADN hechos de mARNs se encontraron en las células testigo pero no en las células adaptadas. Estos experimentos indicaron que la respuesta podría ser atribuida a la inducción de nuevas enzimas y/o a la pérdida de represores en las células irradiadas.

Todos los agentes químicos y las radiaciones que inducen la respuesta adaptativa no son específicos para producir un solo tipo de lesiones en el ADN pero causan rompimientos de una sola hebra o de doble que en principio podrían ser las responsables del fenómeno. Debido a que las radiaciones ionizantes provocan de manera eficiente rompimientos de doble hebra y a que la respuesta adaptativa es mediada por poli(ADP-ribosa)polimerasa, se considera que los rompimientos dobles podrían ser las lesiones responsables del fenómeno. se diseñaron entonces

experimentos con enzimas de restricción, que a diferencia de la radiación ionizante o de los agentes radiomiméticos, sólo inducen lesiones de un tipo específico. Los experimentos se realizaron con linfocitos humanos y las enzimas de restricción fueron introducidas por electroporación para producir rompimientos de doble hebra al ADN en diferentes sitios de reconocimiento y cantidades distintas de. Utilizaron *Alu I* que induce un número elevado de rompimientos terminales en la región AG/CT, *Dra I* que provoca menos que la anterior en TTT/AAA y *Not I* que induce en forma salteada muy pocos en el sitio GC/GGCGC (Wolff 1998).

Las tres enzimas de restricción indujeron adaptación y se observó que el número de rompimientos cromosómicos producidos por una exposición subsecuente a 150 cGy de rayos X se reduce. Además los experimentos mostraron que las rupturas al ADN de doble hebra terminales o intersticiales, pueden ser las lesiones que inducen la respuesta adaptativa pero esto todavía no puede ser considerado como una regla. Sin embargo, los experimentos indicaron sin lugar a duda que la respuesta puede ser causada por niveles mínimos de este tipo de daño que no son reflejadas

como un incremento en las frecuencias de aberraciones cromosómicas (Wolff 1998).

Los estudios realizados con linfocitos humanos han sugerido que las dosis de adaptación, aunque muy bajas, afectan el ciclo celular, quizás mediante mecanismos de señales de transducción que se reflejan en cambios en la sensibilidad a los efectos letales de la radiación. Tales mecanismos que resultan en la reducción del número de aberraciones cromosómicas observadas después de sólo 6 h de aplicar la dosis reto de 150 cGy, pueden ser debidos a que la dosis de adaptación de 2 cGy podrían inducir retraso de G₂ proporcionando más tiempo para la reparación, lo que ocurre antes de que las células sean retadas con 150 cGy y alcancen la metafase. Sin embargo, las evidencias experimentales indicaron que la adaptación no es causada por un cambio en la tasa de progresión de la célula a la mitosis después de una dosis reto. Lo que muestra que el estado de sensibilidad de la célula no es un factor en la inducción, sino que es independiente del retraso del ciclo celular (Wolff 1992).

Las observaciones experimentales con respecto al metabolismo celular sugieren que éste debe estar intacto durante el tiempo entre las dos dosis (intertratamiento, IT) y

que es un prerequisite para la inducción de la respuesta adaptativa. En *Vicia faba* la reducción de la temperatura durante el IT de 24 a 12 °C, impide la disminución del número de aberraciones cromatídicas inducidas por el tratamiento reto característico de la respuesta adaptativa. Estas observaciones están de acuerdo con resultados anteriores en los que se demostró que la inhibición de la síntesis de proteínas por cicloheximida antes de un tratamiento acondicionante, también impide la respuesta adaptativa (Rieger *et al.* 1984, 1986).

Ikushima (1995) utilizó micronúcleos como indicadores del daño cromosómico inducido en células de criceto chino V79 y encontró que las frecuencias de las lesiones provocadas disminuyeron cuando los cultivos fueron pretratados con 1 cGy de timidina tritiada o rayos X y posteriormente con 5 cGy del mismo tipo de radiación. Por su parte, Azzam *et al.* (1992) encontraron en una línea normal de fibroblastos humanos (AG 522) expuesta crónicamente a una dosis total de radiación de 4.25 Gy, a una tasa de 0.3 cGy por minuto, que el número de micronúcleos disminuía antes de administrar la dosis de reto de 4.5 Gy aplicada en un tiempo menor a 2 minutos.

Mediante los estudios realizados en *Drosophila*, se sabe ahora que la respuesta adaptativa parece no estar restringida a las células en cultivo, sino que ocurre también cuando los animales son irradiados “*in vivo*” (Cordeiro *et al.* 1973, Schappi 1994). Se ha demostrado que los roedores machos de la cepa Kummung en estado adulto tienen menos deleciones cromatídicas en sus células somáticas (médula ósea) y germinales (espermatoцитos) después de una dosis de reto de 75 cGy, administrada entre 2.5 y 3 horas después de un pretratamiento con 1 cGy (Cai y Liu 1990).

Sin embargo, no todos los individuos o las cepas responden de igual manera a la dosis de adaptación, existen factores genéticos necesarios para la respuesta, por ejemplo en *D. melanogaster* sólo fue inducida en cepas que tenían el mutante *white* (Schappi 1994). En los humanos Sankaranarayanan *et al.* (1989) encontraron variabilidad individual, ya que sólo 8 de 9 sujetos presentaron respuesta adaptativa y Bossi y Olivieri (1989) la observaron en 14 de 18 individuos.

Debido a la incertidumbre sobre la forma de la curva de dosis respuesta de los niveles bajos de radiación ionizante para el establecimiento del riesgo de estos se han

extrapolado de los resultados obtenidos con dosis altas a los esperados en la región de la curva correspondiente a las de bajas dosis donde no ha sido posible obtener datos experimentales estadísticamente válidos. Este procedimiento ha dado origen a una controversia, así por ejemplo, no queda claro: a) si la extrapolación debe ser lineal, porque las dosis físicas por definición se incrementan linealmente; b) si deben involucrar un umbral, que podría resultar de procesos biológicos que modifican la respuesta inicial o quizás refleja la naturaleza de los eventos biológicos (por ejemplo, los múltiples pasos de la carcinogénesis); o c) si no es lineal, es debido a que la radiación induce procesos de homeostasis que pueden ser inactivados a dosis muy bajas. Aunque hay importantes incertidumbres en todos estos procesos, la hipótesis lineal ha sido la más aceptada por las agencias reguladoras por ser un modo prudente para estimar el riesgo.

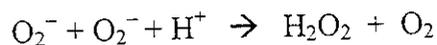
Por otro lado, como ya se ha mencionado, los radicales libres se producen e incrementan, tanto a través de la cadena respiratoria como por la radiación ionizante, provocando estrés oxidante convirtiendo a las condiciones citoplásmicas hostiles. Para este estado

celular han evolucionado mecanismos de defensa en los que se involucra la inducción de enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa de cobre-zinc (Cu-Zn SOD). Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en diferentes organismos incluyendo a los humanos y a *Drosophila*. También se ha descrito que está implicada en algunas enfermedades humanas como la esclerosis (Rosen *et al.* 1993) y que posiblemente actúe en el proceso de envejecimiento (Orr y Sohal 1993) por lo que a continuación se describen algunas características específicas de la SOD de *Drosophila*.

2.6. Superóxido dismutasa

Durante el transporte de electrones al oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria mitocondrial, así como en diversas reacciones de hidroxilación y de oxidación, se pueden formar productos tóxicos o EOR en la reducción parcial del oxígeno, probablemente como intermediarios transitorios sobre los centros activos de enzimas desintoxicantes que después de una serie de reacciones disminuyen la concentración de los radicales libres. Las células aeróbicas, contienen generalmente las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y la

superóxido dismutasa, que convierten al O_2^- en peróxido de hidrógeno y en oxígeno molecular mediante la siguiente reacción de acuerdo con McCord y Fridovich (1969)



El polimorfismo de la superóxido dismutasa (SOD; Superóxido: superóxido oxidoreductasa, EC 1.15.1.1) en *Drosophila*, es particularmente importante como defensa esencial contra la toxicidad del oxígeno y porque en diversas especies de *Drosophila* el grado de polimorfismo varía considerablemente de población a población (Peng *et al.* 1986).

En *D. melanogaster* el gen *Sod*, que codifica para esta enzima, se ha localizado en el cromosoma 3 en el locus 32.5. La proteína es una metaloenzima homodimérica es decir, consiste de dos subunidades, cada una con peso molecular de 16,000 D. En las poblaciones naturales se encuentran dos alelos *Sod^S* y *Sod^F* por su fenotipo de corrimiento en electroforesis en gel: S por "slow" (lenta) y F por "fast" (rápida), con frecuencias variables, aunque el alelo *Sod^F* es siempre el más abundante, los polipéptidos *SOD^S* y *SOD^F* difieren por la sustitución de un solo aminoácido (Hudson *et al.* 1994) y en varias

propiedades químicas. Lo relevante es que la aloenzima S tiene mayor actividad específica que la F. La SOD^S purificada es típicamente capaz de atrapar O₂⁻ a una tasa mayor que la SOD^F (Lee *et al.* 1981b).

La SOD se encuentra en dos formas, una en el citosol o Cu-Zn SOD y otra en la mitocondria o Mn SOD. La SOD de muchas bacterias es muy semejante a la de los organismos superiores en lo que se refiere a su contenido característico de Mn₂⁺ y a la homología de sus secuencias de aminoácidos. La SOD citosólica tiene, por otra parte, una estructura completamente diferente. Esta enzima se halla presente en concentraciones elevadas y es extraordinariamente activa. lo que sugiere que los radicales superóxido se producen continuamente durante la reducción enzimática del oxígeno. los que a su vez, son rápidamente eliminados por diversos sistemas enzimáticos.

La SOD Cobre Zinc de *D. melanogaster* tiene en conjunto un peso molecular de 32,000 D; 2 Cu₂⁺ y 2 Zn₂⁻ por molécula. La enzima es un dímero consistente de dos subunidades de tamaño idéntico unidas por enlaces no covalentes. funciona como un captador catalítico de O₂⁻ (Weisiger y

Fridovich 1971) y tiene las siguientes propiedades bioquímicas:

El producto del alelo *Sod*^F tiene un punto isoeléctrico de pH 4.75 y el de *Sod*^S de pH 5.25. Purificada esta última tiene una actividad específica de 2 a 3 veces más alta que SOD^F. Se ha comprobado que bajo condiciones definidas de análisis, SOD compite con el citocromo 3 (C3+) por el O₂⁻. Los estudios comparados entre las actividades de ambos tipos, sugieren que la SOD^S tiene mayor afinidad por el O₂⁻ que la SOD^F. Esta conjetura fue confirmada con ensayos en los que se utilizaron concentraciones de 2.5 a 15 µM de C3+ frente a las variantes de SOD. A concentraciones bajas del citocromo, la eficiencia de las dos formas de la enzima fue casi la misma pero cuando éstas fueron mayores, la actividad de SOD^F disminuyó más rápido que la de SOD^S. Se calculó que la variante S es capaz de atrapar O₂⁻ a una tasa aproximada de 2.7 veces más rápido que la F (Lee *et al.* 1981b).

La termoestabilidad de Cu-Zn SOD de ambas variantes se analizó por gradientes de temperatura. Estos estudios indicaron que a 50°C la enzima no pierde actividad durante varias horas pero a 70°C la deteriora completamente en un lapso de 5

minutos. Adicionalmente se observó que a 60°C hay una pérdida gradual de la actividad catalítica en donde la tasa de decaimiento es significativamente mayor para SOD^S que para SOD^F (Lee *et al.* 1981b).

La composición de aminoácidos de las dos formas de la enzima indicó que difieren en una sustitución. La lisina en SOD^S es reemplazada por ácido aspártico o asparagina en SOD^F. Sin embargo, con la comparación de cepas californianas con africanas, se descubrió que SOD^S y SOD^F difieren por dos sustituciones de aa, histidina y prolina en la primera y serina y ácido glutámico o glutamina en la segunda (Lee *et al.* 1985). Las diferencias de los aminoácidos son consistentes con la movilidad electroforética y su punto isoelectrico (Lee *et al.* 1981a).

Hudson *et al.* (1994) reportaron que de 19 variantes caracterizados de los alelos *Sod*^S y 22 de *Sod*^F, todas los primeros y 9 de los segundos fueron idénticos entre sí en su secuencia. Estos últimos los refirieron como haplotipos A rápidos y los 13 restantes fueron distintas entre sí. La secuencia del alelo *Sod*^S difiere del haplotipo A rápido en un sólo nucleótido y es congruente con la composición de aminoácidos y el sitio en el

que difieren las dos electroformas. De los resultados anteriores concluyeron que el polimorfismo del gen *Sod* es de aparición reciente.

La secuencia nucleotídica del gen *Sod* de *Drosophila* consiste de dos exones separados por un intrón de 725 pb. El primer exón codifica para la metionina N-terminal y los primeros 21 aa de la proteína. El segundo exón codifica para los 131 aa siguientes y para el codón TAA de terminación. Una comparación con la región que codifica del gen SOD de *Drosophila* con el de rata y humano mostró que tiene 57 % de homología con la de rata y 56 % con la de humano. La región del ADN codificante tiene concentraciones altas de guanina y citocina y hay una relativa preferencia por los codones con terminación C y G del 28% (Seto *et al.* 1989).

La localización citogenética del gen Cu-Zn *Sod*, determinado por hibridación *in situ* en cromosomas politénicos de glándulas salivales, fue detectada en la posición 68A4-9 que está dentro de la región 68A2-C1 (Campbell *et al.* 1986). La sonda del gen *Sod* también hibridizó en la misma posición en el mutante SOD nulo lo que indicó que está presente el ADN homólogo

a este gen en el mutante *null* a pesar de los niveles bajos de enzima que sintetiza (Seto *et al.* 1989).

La secuencia nucleotídica del gen *Sod^F* fue descrita por Seto *et al.* (1987) y una secuencia parcial del gen *Sod^S* por Kirkland y Phillips (1987). Estos reportes señalan que la secuencia del cADN difiere de la secuencia del clon *Sod* genómico en dos sustituciones lo que se refleja en variaciones entre cepas como es el caso de la indú y la californiana.

Está por determinarse si la selección natural se involucra en las diferencias entre ambas y si estas variaciones proporcionan variantes adaptativas que les permitan a sus portadores tener eficiencia biológica que, a su vez, está en función de la eficacia reproductora. En términos poblacionales la adaptación esta relacionada con los individuos que presentan ciertos genotipos que transmiten sus genes a la generación siguiente con mayor frecuencia que los que presentan otros genotipos. Por definición la selección natural favorece la eficacia biológica, que resulta siempre benéfica para el individuo o para la población y que además corre siempre en paralelo con la adaptación, buena salud, mayor capacidad de supervivencia y mayor adaptabilidad a

ambientes variados. Puede comprobarse empíricamente si un cambio evolutivo determinado es debido a diferencias en la eficacia biológica, es decir a la selección natural y que el cambio evolutivo consiste simplemente en una consecuencia de la selección natural que favorece la adaptación de los organismos a su ambiente.

Para explicar una adaptación particular, un argumento seleccionista ha de mostrar que está implicada la selección natural y que ésta favorece la adaptación en cuestión. No obstante, la adaptación constituye, a pesar de todo, un concepto difícil de definir. Las adaptaciones ya sea fisiológicas, morfológicas o etológicas pueden reconocerse tanto en los individuos como a nivel de la población. Ayala (1969) ha sugerido la utilidad como criterio para identificar las adaptaciones y considera que una característica de un organismo es una adaptación si presenta utilidad para él y si tal utilidad explica la presencia de la característica. De las distintas variantes genéticas, algunas dan lugar a características útiles para sus portadores como adaptaciones al ambiente. Los individuos con adaptaciones útiles, es probable que dejen mayor cantidad de descendientes que los que no las usan a

causa de las condiciones ambientales que pueden ser circunstanciales.

Las variantes hereditarias responsables de la adaptación se seleccionan naturalmente a través de las generaciones, se incrementan en frecuencia o en aptitud. No obstante, se requiere comprender la bioquímica, la fisiología y otros efectos del fenotipo de las variantes alélicas, así como la relevancia de los fenotipos alternativos para las condiciones ambientales particulares.

Es necesario comprender si existe una correlación positiva entre adaptación y sobrevivencia que conllevará a una capacidad mayor de transmitir genes a la siguiente generación. En este caso se conocen numerosos polimorfismos de genes que codifican para enzimas y otras proteínas. Si estos polimorfismos son mantenidos por selección natural, es necesario demostrar sus efectos adaptativos.

Como se mencionó en *D. melanogaste*, las variantes de la enzima difieren en sus propiedades bioquímicas. SOD^S presenta mayor actividad específica a una tasa constante mayor pero es menos termoestable que SOD^F. Estas diferencias hacen posible que una forma de la enzima sea superior a la otra bajo ciertas

condiciones ambientales, pero inferior si estas cambian, aparentemente, así debería ser. Sin embargo, estos resultados se obtuvieron de experimentos *in vitro* y por consiguiente la determinación de su importancia *in vivo* todavía es materia de investigación. Las diferencias biológicas observadas indican que algunos factores ambientales pueden afectar la adecuación de los alelos involucrados, por esta razón se considera que estas diferencias proporcionan una guía para realizar experimentos apropiados *in vivo* y conocer más acerca del valor adaptativo de las variantes.

Se ha demostrado que mutantes de *Escherichia coli* carentes del gen *Sod*, catalasa o peroxidasa, tienen intolerancia al oxígeno, lo que sugiere la posibilidad de una unión genética entre las enzimas que protegen contra los efectos nocivos de la radiación ionizante (Fridovich 1978). Se ha determinado que la glutation-peroxidasa (GSH-Px) también participa en la protección contra la radiación y que su síntesis se incrementa en situaciones de estrés de radiación, al igual que la catalasa, por lo que pueden ser buenos indicadores biológicos (Godbold *et al.* 1993, Leccia *et al.* 1993). También se ha encontrado que son radioinducibles en la caña de azúcar

(Singh *et al.* 1993, Rohilla y Singh 1992) y en la germinación y crecimiento de semillas cuando éstas se exponen a radiación (Zhang-Chaomei 1993). Por otro lado, Harman (1981) y Fleming *et al.* (1987) en estudios con *Drosophila* sugieren que tanto la tasa respiratoria como la capacidad de los tejidos para atrapar especies reactivas de oxígeno son determinantes importantes del tiempo de vida. Lo anterior está apoyado por las observaciones de Tolmasoff *et al.* (1980) quienes señalan que en los vertebrados superiores hay una correlación directa entre longevidad y los niveles de SOD.

Sin embargo, existe mucha incertidumbre acerca de los efectos que pueda tener la exposición crónica a dosis bajas en poblaciones naturales, debida a la inconsistencia de los resultados obtenidos con los diferentes sistemas de prueba y porque no hay métodos estadísticos que puedan determinar claramente algún efecto, lo que como consecuencia, lleva a concluir que hasta el momento no existe el sistema ideal para hacer la cuantificación de los efectos del impacto que pudiera tener la operación de una planta nucleoelectrica sobre las poblaciones naturales.

El presente estudio incluye el análisis a largo plazo de la radiosensibilidad, estimada a través de la viabilidad huevo-adulto y el análisis de las frecuencias alélicas del gen de la superóxido dismutasa de las dos especies mencionadas, colectadas periódicamente de una población natural, para de esta manera, estimar si la Central Nuclear tiene impacto ecológico a largo plazo sobre *D. melanogaster* y *D. simulans* y si el presunto impacto ocurre de igual manera en ambas especies.

Sin embargo, vale la pena aclarar que no se pretende utilizar a *Drosophila* como monitor para niveles bajos de radiación. Tampoco determinar a través de los resultados obtenidos, si la Planta Nuclear es segura o no, ya que ésta tiene en su organización sus propios sistemas de seguridad y monitoreo, sino, hacer un estudio con poblaciones naturales de esta especie que habita en los alrededores de la planta, para una vez concluida la vida útil de una Central Nucleoelectrica como la de Laguna Verde, se pueda estimar en que grado pudieran afectarse o modificarse algunos factores de valor adaptativo de estas poblaciones.

3. HIPOTESIS

Si debido a que las poblaciones han estado expuestas durante generaciones sucesivas a niveles alterados de radiación de fondo, la radioresistencia de *Drosophila melanogaster* y *D. simulans* del Sitio II se ha incrementado, entonces la frecuencia del alelo Sod^S con respecto a la del Sod^F del locus *Sod* se modificará.

4. OBJETIVO

Estudiar la dinámica del polimorfismo del gen de la superóxido dismutasa de poblaciones naturales de *D. melanogaster* y *D. simulans* de Laguna Verde, Veracruz.

4.1. Objetivos específicos

- a) Estimar mediante la viabilidad huevo-adulto el grado de radiosensibilidad de ambas especies.
- b) Estimar las frecuencias alélicas relativas de SOD^S y SOD^F de ambas especies.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La Central Nucleoeléctrica está localizada en el Golfo de México en el Estado de Veracruz en 96°24'30" de longitud W y 19°43'24" de latitud N, aproximadamente a 75 km al Norte de la ciudad de Veracruz.

Laguna Verde es una área de cambio en cuanto a la precipitación; al SW se presentan precipitaciones de 1000 mm anuales y muy cerca, hacia el N llega a los 2000 mm (Halffter y Reyes 1975). La estación de lluvias comprende de julio a principios de noviembre (1321 mm) siendo de enero a mayo los meses verdaderamente secos (68.8 mm). La temperatura media anual es de 25.09 °C, y la máxima es de 28 °C, correspondiente al mes de mayo y una mínima de 20.8°C a febrero. La evaporación total anual es de 1738 mm con un valor máximo de 196.7 mm en marzo y un valor mínimo de 98.7, que corresponde a enero.

La dirección de los vientos dominantes es NNW con una intensidad promedio anual de 4.81 m/seg (Figura 2) (GPNLV, 1991).

La vegetación pionera sobre arena ocupa una extensión amplia de dunas móviles o parcialmente estabilizadas en las playas situadas al Este de las lagunas de Boca

Andrea, Verde y Salada. En estas dunas se encuentran principalmente especies que presentan crecimiento por estolones o plantas herbáceas y arbustivas de aspecto tendido. Las dominantes son dos especies: *Sesuvium portulacastrum* y *Palafoxia texana* y en los lugares inundables o en el borde de Laguna Verde es predominante la especie *Cyperus articulatus*. Hacia el Norte de Laguna Verde, hay un fragmento de selva baja subcaducifolia sobre una duna que llega hasta la orilla de la laguna. Esta selva está compuesta principalmente de *Enterolobium cyclocarpum* asociada a otras especies.

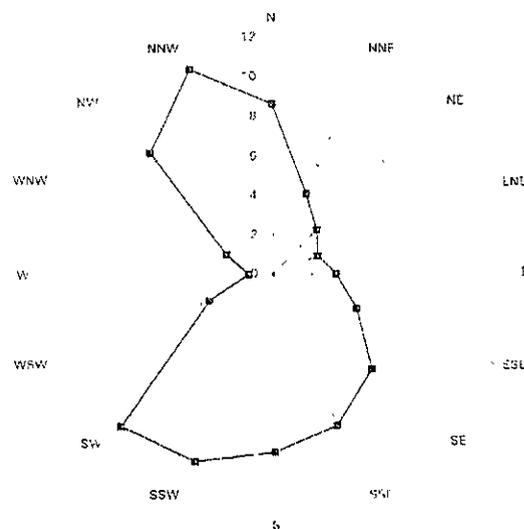


Figura 2 Rosa de vientos de la Estación Central Laguna Verde. Frecuencia relativa total (%) de la dirección del viento (Contreras *et al* 1995)

La mayor parte de los terrenos planos o con poco declive están ocupados por pastizales inducidos de *Panicum maximum* o por

formaciones secundarias que resulta del abandono de éste. Dentro de los pastos, persisten en mayor cantidad, elementos de la selva subcaducifolia como *Sabal mexicana*, *Tecoma stans*, *Randis laetevirens*, *Bursera simaruba* y árboles como *Tabebuia rosa* y *Chlorophora tinctoria* que pueden alcanzar hasta 20 m de altura además de manchones de *Bromelia pinguin*. El manglar ocupa superficies reducidas de suelos fangosos e inundables en las orillas de Laguna Salada y en menor extensión, en la Laguna de Boca Andrea. La planta más abundante es *Avecennia germinans*, que forma agrupaciones casi puras en la mayor parte del área cubierta por manglar (Halffter y Reyes 1975).

5.1. Sitios de colecta

Se establecieron dos Sitios de colecta; el Sitio I está en la zona habitacional, situado a 1350 m al NW de los reactores nucleares al SW de la Laguna Verde aproximadamente a 50 m sobre el nivel del mar (población testigo) y el Sitio II que está en la zona del manglar o zona de escolleras, localizado a 100 m al S de los reactores cerca de 1 ó 2 m sobre el nivel del mar (población experimental) (Figura 3).

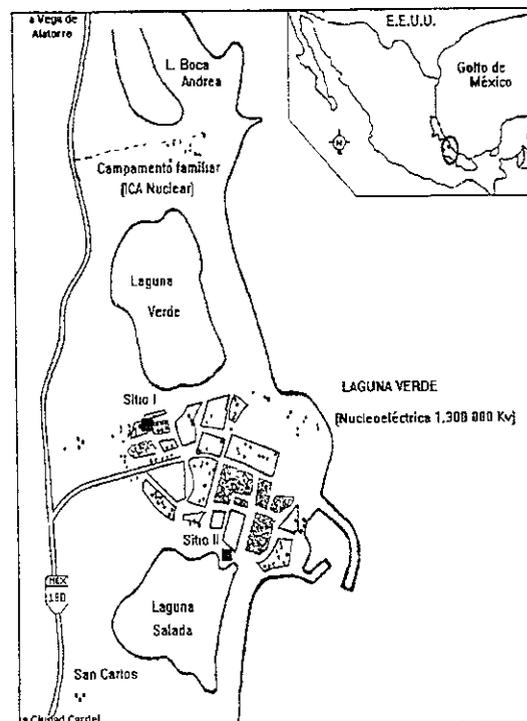


Figura 3 Ubicación de los sitios de colecta en la Central Nuclear de Laguna Verde. Sitio I (población testigo) y Sitio II (población experimental)

El Sitio II experimental fue seleccionado basándose en la dirección de los vientos predominantes de la zona (de Norte a Sur) (Figura 2) y en la ubicación de la salida del agua de enfriamiento de los reactores. De acuerdo con la hipótesis esto somete a las poblaciones que habitan en este lugar a una posible sobreexposición de radiación y es probable que provoquen un impacto sobre ellas. En este Sitio se hizo la primera colecta en julio de 1987 y se han realizado continuamente 20 durante un periodo de 10 años, que comprende de 1987 a 1997 y en el Sitio I la primera colecta fue en enero de 1991 y se prosiguieron por un periodo de 7

años hasta 1997. En cada uno de los sitios se realizaron dos colectas anualmente, una en enero y otra en julio que corresponden a la temporada de secas y de lluvias, respectivamente (Halfpter y Reyes 1975).

Las moscas fueron atraídas con fruta (piña o plátano) contenida en trampas que se distribuyeron en cada sitio en una área de aproximadamente 2500 m² durante el amanecer y el atardecer, ya que los hábitos alimenticios de estos organismos obedecen a un ciclo circadiano; se atraparon con una red entomológica, finalmente se contaron y se seleccionaron las especies en estudio *in situ*.

5.2. Establecimiento de isolíneas

Las hembras colectadas en la naturaleza se sembraron en tubos homeopáticos con alimento convencional, de harina de maíz, agar, levadura de cerveza y sacarosa. A partir de la descendencia de cada hembra colectada y fertilizada en la naturaleza, se establecieron líneas, denominadas isolíneas (Parsons, 1975; Levine *et al.* 1989). El número de isolíneas o tamaño mínimo de muestra para este tipo de estudio se basó en los reportes de la literatura, por ejemplo Parsons (1975) recomienda de 6 a 12 isolíneas y Levine *et al.* (1989) de 9 a 12.

Para esta investigación y dependiendo de la abundancia de moscas en el campo se utilizaron de 8 a 20 isolíneas. Cada muestra se identificó con el sitio (I ó II), año (97...) y el mes (01 ó 07) en que fue obtenida. Posteriormente las moscas de la F1 se trasvasaron dos veces cada tercer día para aumentar el tamaño de la población de cada una de ellas.

5.3. Colecta de huevos

De cada isolínea se pusieron grupos de 50 parejas de la F2, en frascos lecheros de 1/4 de litro vacíos, estos se invirtieron sobre cajas de Petri de 5 cm de diámetro con alimento. De esta forma las hembras pusieron los huevos necesarios para los experimentos por un periodo de 3 a 4 h. Después las cajas Petri fueron retiradas e inmediatamente se colectaron 960 huevos de cada isolínea en grupos de 80.

Luego se organizaron cuatro lotes con tres repeticiones de 80 huevos cada uno y se colocaron en otra caja Petri para irradiarlos con 0, 4, 6 y 8 Gy de rayos gamma, respectivamente (1 Gy = 100 rads). Después de la irradiación, los huevos fueron depositados en tubos homeopáticos de 9 cm de altura y 2.5 cm de diámetro con alimento. Todos los lotes se pusieron en un

cuarto de cultivo a 25 ± 2 °C y 60 % de humedad relativa para que concluyeran su desarrollo. Todos los experimentos se realizaron con individuos de la generación F3 y cada tratamiento se hizo por triplicado. Después de 12 días se contaron los adultos emergidos de cada tubo (Figura 4).

5.4. Fuente de radiación

Los huevos fueron irradiados en un "Gammacell" experimental cuya razón de dosis en el tratamiento de la última muestra fue de 0.05846771 Mrad/h. En éste equipo, las muestras fueron colocadas en la parte central del interior del émbolo para irradiarlas con rayos gamma de una fuente de cobalto-60, dispuesta radialmente al cilindro, lo que garantizó que las muestras se irradiasen uniformemente. La actividad del Co^{60} se verificó al tiempo de cada irradiación.

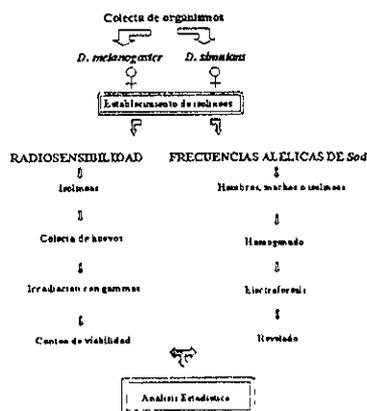


Figura 4 Metodología

5.5. Electroforesis

El equipo que se utilizó fue un LKB 2117-301 unidad básica Multiphor y un paquete LKB 2117-201 para electroforesis Multiphor (Figura 5).

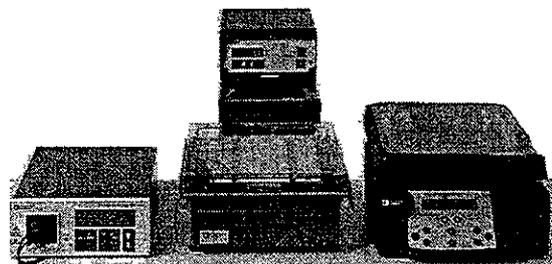


Figura 5 Equipo para electroforesis LKB 2117-301

5.5.1. Soluciones

Acrilamida: consiste de 22.2 g de acrilamida (Sigma) más 0.6 g de N, N'-Metenbisacrilamida (Bis) Bis-acrylamida (Sigma) disueltas en 100 ml de agua destilada y filtrada con papel filtro del No. 1 (Davis 1964; LKB Application 1977).

Persulfato de amonio: 100 mg de persulfato de amonio en 10 ml de agua destilada.

Ambas soluciones se mantienen en obscuridad a 4 °C (LKB Application 1977).

Amortiguador gel y electrodo: 87 mM de Tris, 8.7 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA, y 1 mM de $\beta\text{-NAD}^+$ a pH 9.0 (Ayala *et al.* 1972).

Tinción: a) solución de azul de tetrazolio (NBT) a 2.45 mM (Beauchamp y Fridovich 1971).

b) solución a pH 7.8 de tetrametilediamina (TEMED) a 0.028 M, riboflavina a 0.028 mM y fosfato de potasio a 0.036 M (Beauchamp y Fridovich 1971).

Preservadora: 300 ml de alcohol etílico; 100 ml de ácido acético y 100 ml de glicerol y llevar a 1000 ml con agua destilada (LKB Application 1977).

5.5.2. Preparación del gel

Se lavó todo el material con detergente de laboratorio y se enjuagó bien con agua destilada, después se preparó el molde para el gel verificando que no hubiera fugas, posteriormente se preparó el gel al 10% de la siguiente manera: se mezclaron 33 ml del amortiguador gel con 29.7 ml de la solución de acrilamida, luego se añadieron 3.2 ml de persulfato de amonio y 0.1 ml de TEMED y se mezcló cuidadosamente. Las pequeñas burbujas formadas se eliminaron con vacío durante veinte segundos. Inmediatamente después se vertió la solución en el molde y se dejó a que se polimerizara durante aproximadamente 40 min, después se colocó en refrigeración. Para usarlo se retiraron del molde, el peine y las ligas. El

gel puede ser utilizado después de 15 min a 12 h de haber endurecido (LKB Application 1977).

5.5.3. Preparación de las muestras

Los machos colectados en la naturaleza se molieron individualmente con 20 μ l de amortiguador (Ayala *et al.* 1972), posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante dos minutos. El mismo procedimiento se realizó con los descendientes de la F1 de las hembras. Después se pusieron 10 μ l de sobrenadante de cada muestra, por pozo. El gel se colocó horizontalmente sobre las celdas en contacto con el amortiguador con papel filtro del No.1. El corrimiento se hizo a 4 °C y 120 V durante 4 a 5 h de acuerdo con Beauchamp y Fridovich (1971) y Ayala *et al.* (1972).

Después del corrimiento el gel se retiró de las celdas y se sumergió en la solución de tinción de azul de tetrazolio por 20 min seguido por una inmersión en la solución a pH 7.8 por 15 min. Después se expuso a la luz hasta que aparecieran las manchas transparentes características de la SOD en un fondo azul.

5.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos sobre la viabilidad huevo-adulto y la radiosensibilidad se analizaron mediante estadística descriptiva paramétrica con la prueba de t de student para determinar todas las posibles diferencias, estableciendo un nivel de significancia de 0.05 y mediante una MANOVA o análisis de varianza multifactorial para mediciones repetidas y así determinar todas las posibles diferencias a través del tiempo.

También se hizo un análisis de normalidad de los resultados de todos los tratamientos, mediante el cálculo de la norma de los residuales para determinar matemáticamente el modelo que defina el comportamiento de la radiosensibilidad a través del tiempo.

Los resultados de las frecuencias alélicas se analizaron con la prueba de X^2 a un nivel de significancia de 0.05.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

- En febrero de 1989 y en abril de 1994 se inicio el funcionamiento de los reactores denominadas unidad 1 (U1) y 2 (U2), respectivamente. Para ambos reactores el primer año de operación fue fundamentalmente un período de prueba. Las emisiones radioactivas proporcionales, se calcularon cada semana y nunca han excedido los límites permisibles (comunicación personal).

los datos obtenidos de las dos primeras colectas del Sitio II de 1987 se reportaron previamente en Rosa de la *et al.* 1989 a, b y se incluirán en el presente estudio para hacer las comparaciones convenientes. De 1987 a 1990 no se tienen datos del Sitio I debido a que no fue posible establecerlo desde que se inició el estudio por razones ajenas al proyecto. Por consiguiente, en este sitio se hicieron en total catorce colectas durante un periodo de 7 años que comprende de enero de 1991 (9101) a julio de 1997 (9707) y en el Sitio II veinte de julio de 1987 (8707) a julio de 1997 (9707). En invierno de 1988 (8801) no hubo suficientes organismos durante la colecta para ser analizados.

En la tabla 1 están acumulados los resultados obtenidos de la radiosensibilidad medida con la viabilidad huevo-adulto (VHA) de ambas especies y expresada en proporción de eclosión (PE) o fracción de viabilidad de cada huevo. Esta tabla esta subdividida en dos grupos, correspondientes a los datos obtenidos del Sitio I y del II, respectivamente, cada grupo se subdivide en los datos de *D. melanogaster* y los de *D. simulans* de cada lugar. La primer columna de la tabla 1 corresponde a la fecha en que se realizó el muestreo, en la segunda las dosis que fueron probadas expresadas en Gy o tratamiento. De izquierda a derecha los resultados de cada especie tiene en el orden, la proporción de eclosión promedio (\bar{X}), el error estándar (EE), el tamaño de la muestra (n) y la t de student calculada.

6.1. Viabilidad huevo-adulto (VHA)

Aquí se presentan los resultados obtenidos con organismos sin tratamiento de cada especie y de cada sitio con el fin de destacar el comportamiento de este carácter con respecto al tiempo y facilitar las comparaciones con los tratamientos y las frecuencias de SOD.

6.1.1. Comparación entre especies

Tanto en el Sitio I como en el II se observó que *D. melanogaster* tiende a tener mayor PE o viabilidad que *D. simulans*. En la tabla 1 se puede ver que esta tendencia es en 10 de 14 de las colectas del Sitio I y en 13 de 20 del Sitio II. Sin embargo, la diferencia entre ambas especies fue significativa sólo en 6 (9101, 9201, 9401, 9407, 9601 y 9701) y en 3 (9001, 9101 y 9601) de cada sitio respectivamente ($p < 0.05$).

Para hacer un análisis del comportamiento de la VHA de ambas especies a través del tiempo se calcularon las curvas de los datos experimentales mediante la ecuación $f(t) = a \cdot \text{Sen}(bt) + c$ en donde a , b y c son parámetros a determinar y t es el tiempo. Para lo anterior se verificó primero la bondad de ajuste mediante el cálculo de la norma de los residuales para asegurarse que la mayoría de los datos estuvieran contenidos en el intervalo $\pm 2\sigma$. Con lo anterior se encontró que los residuales tienen un comportamiento estadísticamente normal ya que presentan valores de la media cero y desviación estándar uno. Con este análisis se estimó que el comportamiento de la VHA es aparentemente de forma sinusoidal con

una periodicidad aproximada de tres años para ambas especies de cada sitio (Tabla 2).

Las comparaciones estadísticas entre especies indicaron con la prueba de t que no hay diferencias ni en las poblaciones correspondientes al Sitio I ni en las del II, $t = 0.068$ y 0.078 , respectivamente. No obstante, con la prueba de MANOVA las diferencias fueron muy significativas $p < 0.001$ (Tabla 3). No existe suficiente literatura sobre poblaciones naturales de *Drosophila* relacionada con este tipo de estudios pero con los resultados de viabilidad obtenidos con cepas de laboratorio se demostró que *D. melanogaster* tiene valores de adaptación superiores a los de *D. simulans* por ejemplo, es más resistente a los efectos de la exposición a dosis alta de radiación gamma (Parsons 1975); tiene mayor longevidad (Mckenzie 1978); la retracción larvaria es mayor lo que le proporciona una ventaja para la competencia por el alimento y necesidad de un mayor nicho (Ohnishi 1979) y se aclimata mejor a las bajas temperaturas (Hoffmann y Watson 1993). Por su parte Rockwell *et al.* (1991) encontraron con las mismas poblaciones provenientes de Laguna Verde que *D. melanogaster* es más resistente a la desecación que *D. simulans* después de 8 h

de estrés de agua. Estas diferencias pueden ser atribuidas a que *D. melanogaster* tiene una proporción alta de loci polimórficos y mayores diferencias geográficas que *D. simulans* (Choundhary y Singh 1987).

6.1.2. Comparación entre Sitios

En la figura 6 están representados los datos de los testigos de cada especie. En las poblaciones del Sitio II de 8707 a 9107 hay cambios muy pronunciados de la PE que van, en *D. melanogaster* desde 0.538 hasta 0.264 y en *D. simulans* de 0.450 a 0.285 y posteriormente se estabilizan haciendo modificaciones más graduales (Figura 6b). Para las poblaciones provenientes del Sitio I no se tienen datos durante estas fechas, no obstante, se puede ver que durante todo el período analizado el comportamiento de la VHA de ambas especies es parecido al de los primeros años del Sitio II ya que se tienen oscilaciones de la PE también grandes y son para *D. melanogaster* de 0.515 a 0.309 y para *D. simulans* de 0.481 a 0.307 (Figura 6a). Este comportamiento probablemente se deba a diferencias en las características de los dos sitios. El único dato que se tiene para sustentar esta hipótesis es que el Sitio I corresponde a un lugar habitado por el hombre y el II no. Las diferencias de la VHA entre los sitios se

puede ver más claramente en la Figura 7 a y b.

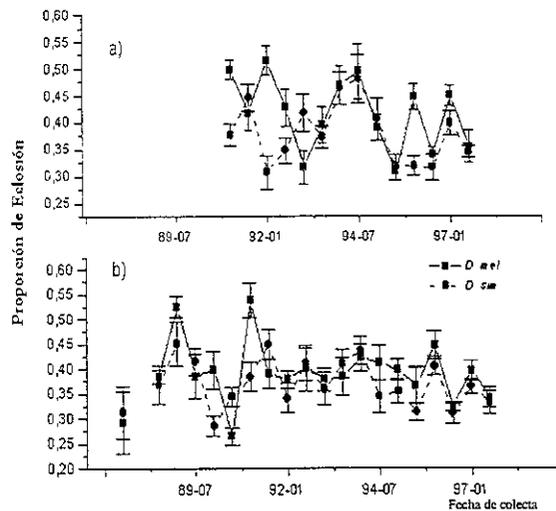


Figura 6. Comparación entre ambas especies a) Sitio I y b) Sitio II

Aparentemente hay una relación entre las temporadas de lluvias y de secas y la VHA durante el periodo analizado. De 1987 a 1990 de acuerdo con los datos de la estación de monitoreo de la de Central y considerando la precipitación de la zona, no se distinguen claramente las dos temporadas ya que los valores de este factor meteorológico son muy parecidos en ambas, pero a partir de 1991 a 1997 son más claras las diferencias entre ellas; se puede observar tanto mayor precipitación en las temporadas de lluvias como menor en las de secas con respecto a los años anteriores. Por otro lado, parece no haber correlación de la temperatura de la zona con la VHA ya que el promedio de ésta de

cada temporada es prácticamente indistinguible durante todo el período (Tabla 4).

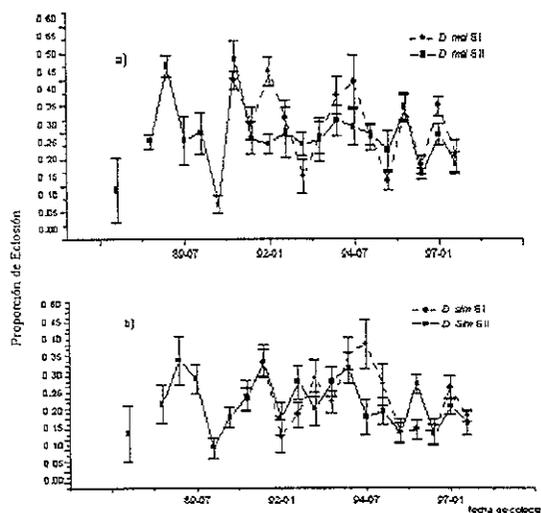


Figura 7. Comparación de la proporción de eclósión de a) *D. melanogaster* SI vs SII y b) *D. simulans* SI vs SII

Las curvas que estimaron los ciclos de la viabilidad de cada especie que corresponden a las poblaciones del Sitio I, son paralelas y destaca que la de *D. melanogaster* está sobre la de *D. simulans* lo que confirma las diferencias entre ambas especies (Figura 8a). Con el número de muestras analizadas de 9101 a 9707 en el Sitio I y con la periodicidad mencionada antes, sólo se incluyen dos ciclos en los que las crestas coinciden en la temporada de lluvias y los valles en la de secas. De acuerdo con el análisis matemático cada período o ciclo ocurre aproximadamente cada año y medio.

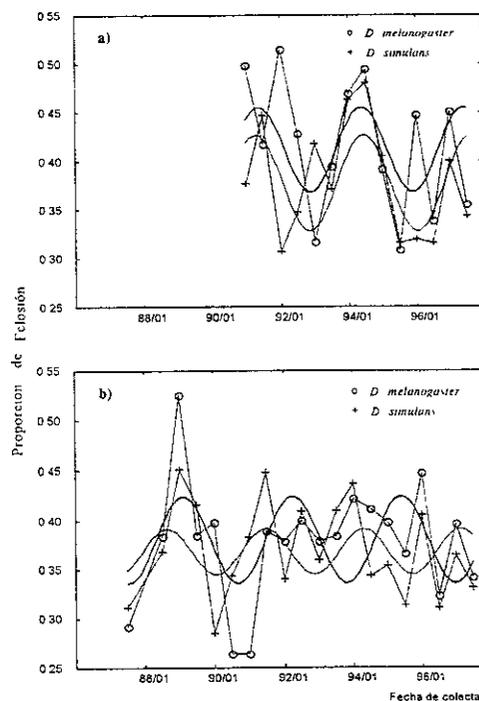


Figura 8. Ciclos obtenidos con la proporción de eclósión de los grupos testigo de cada especie a) del Sitio I y b) del II

En comparación, las curvas de las especies del Sitio II presentan desfase entre sí; *D. melanogaster* tiene ciclos más largos que *D. simulans* (Figura 8b). En este caso el período de colectas, incluye tres ciclos donde las crestas de los dos primeros coinciden en la temporada de secas y los valles en la de lluvias para *D. melanogaster*. En el caso de los ciclos de *D. simulans* las crestas en temporada de lluvias y los valles en la de secas pero en el último ciclo de ambas especies, se hace evidente un desplazamiento con el que se invierte la relación. Sin embargo, los análisis estadísticos con la prueba de *t* y

MANOVA indicaron que no hay diferencias entre ambos sitios.

6.1.3. Comparación entre temporadas

Tomando en cuenta todos los resultados de la VHA de los organismos de los dos sitios, colectados en ambas temporadas se puede ver que las PE de las muestras de lluvias son menores que las PE correspondientes a la de secas para las especies de los dos sitios (Figura 7)

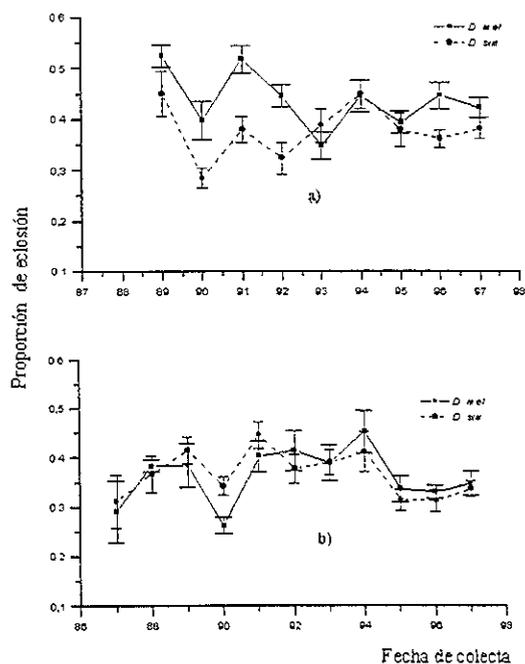


Figura 9. Comparación de la proporción de eclosión de *D. melanogaster* vs *D. simulans* de la temporada de a) lluvias y b) secas

No obstante, sólo se presentaron diferencias significativas en las muestras 9101, 9201, 9401, 9601 y 9701 del Sitio I y en 9001, 9101 y 9601 del II a favor de *D. melanogaster*. Tomando en cuenta todo el

periodo analizado la PE de *D. melanogaster* del Sitio II es significativamente mayor en la temporada de secas a una $p < 0.05$ (Tabla 5).

Para hacer el análisis comparativo de las dos temporadas y debido a que no se encontró diferencia estadística entre los dos sitios, los datos se manejaron conjuntamente considerándose como un sólo lugar con dos especies, para estimar con más claridad las posibles diferencias entre las temporadas. Los resultados están acumulados en la tabla 6 y en la figura 9 en las que se puede ver que no se presenta un comportamiento simple de la VHA para ambas especies. *D. melanogaster* de 1987 a 1992 tiene mayor PE en la temporada de secas respecto a *D. simulans*; de 1993 a 1994 es prácticamente igual en ambas temporadas y de 1995 a 1997, de nuevo es igual que en los primeros años (Figura 9a). No obstante, las diferencias entre las dos temporadas son muy significativas ($p < 0.01$). En el caso de *D. simulans* los resultados son un poco diferentes, de 1989 a 1993 la PE en la de secas es menor y de 1993 a 1997 es mayor (Figuras 9a) estos cambios en la PE son significativos ($p < 0.05$). En la temporada de lluvias de 1987 a 1992 la relación es a la inversa entre ambas especies (Figura 9b). No se tiene

una explicación fundamentada para estos resultados pero por la forma de las curvas se podría pensar que las PE de ambas especies guardan una relación alternada que muy probablemente les sirve para evitar la competencia por el hábitat. Sin embargo, a partir de 1993, la PE guarda la misma relación entre ambas especies y en la temporada de secas es mayor significativamente que en la de lluvias. La explicación de este comportamiento no es simple pero llama la atención que coincide con el año en que entró en funcionamiento el segundo reactor (abril de 1994), aunque esto puede ser circunstancial.

6.2. Radiosensibilidad

Este punto se refiere a los resultados obtenidos con los tres tratamientos de radiación: 4, 6 y 8 Gy de rayos gamma y se hacen las respectivas comparaciones con los grupos testigos de cada especie y de cada sitio

6.2.1. Comparación entre especies

Con el tratamiento de 4 Gy de rayos gamma, en el Sitio I *D. melanogaster* tuvo significativamente mayor PE que a *D. simulans* en 3 muestras (9101, 9201, 9601) con la prueba de *t* a un nivel de 0.05, pero al considerar el total de los resultados, la

diferencia entre las dos especies no fue significativa. Igualmente en el Sitio II, *D. melanogaster* presentó mayor PE en 10 pero sólo en dos (9001 y 9407) fue significativa (Tabla 1), en contraste en *D. simulans* la PE no tuvo diferencias estadísticas (Tabla 7).

Los huevos de *D. melanogaster* tratados con 6 Gy del Sitio I presentaron mayor PE que *D. simulans* significativamente en siete muestras a un nivel de 0.05 (9101, 9201, 9301, 9401, 9407, 9601 y 9701). En el Sitio II se observó la misma tendencia sólo 7 presentaron diferencias significativas (9001, 9101, 9201, 9301, 9407, 9501 y 9601) (Tabla 1). La comparación de todos los resultados de las colectas entre ambas especies no indicaron distinción. Es importante hacer notar que las colectas en las que se encontraron diferencias estadísticas no son al azar debido a que hay un 71 % de coincidencia en las muestras en las que hay diferencias significativas en ambos sitios e incluyen por lo menos una muestra de cada año monitoreado. No obstante, estas equivalencias sólo establecen diferencias entre ambas especies.

Con 8 Gy de tratamiento, *D. melanogaster* mostró mayor PE que *D. simulans* en

ambos sitios y durante todo el período; las diferencias entre ambas especies fueron significativas ($p < 0.05$). La tabla 7 también contiene los resultados de las comparaciones anteriores realizadas con la prueba de t . Así mismo están indicadas las diferencias estadísticas de los tratamientos con respecto a los testigos. Estas últimas evidentemente indicaron una relación de dosis respuesta consistentemente tanto con la prueba de t como con la de MANOVA (Tablas 7 y 8).

6.2.2. Comparación entre Sitios

De la misma forma en que se ordenaron los resultados en la tabla 1, se presentan en la Tabla 9 con la diferencia de que en esta última los resultados están agrupados según el tratamiento con el fin de facilitar las comparaciones. Se muestran los resultados a partir de la fecha en que en ambos sitios se analizaron muestras. Se incluyen dos columnas que corresponden al valor de la t de la comparación del Sitio I con el II, la primera se refiere a *D. melanogaster* y la segunda a *D. simulans*. De los resultados de los tratamientos con 4 Gy se puede observar que las muestras con diferencias son en 5 para cada especie (9107, 9201, 9307, 9401 y 9701 para *D. melanogaster* y en 9101, 9201, 9301, 9407 y 9601 para *D. simulans*).

En las tratadas con 6 Gy las diferencias significativas fueron en tres de *D. melanogaster* (9101, 9307 y 9701) y cuatro de *D. simulans* (9107, 9307, 9401 y 9601). Con 8 Gy vuelve a ser en cinco de *D. melanogaster* (9101, 9201, 9401, 9607 y 9701) y en 7 de *D. simulans* (9101, 9107, 9207, 9301, 9401, 9601 y 9607). Las muestras en las que hubo diferencias se consideran al azar ya que en ocasiones las poblaciones del Sitio I tienen mayor PE que las del Sitio II y viceversa. Por otro lado no se encontró correlación entre las diferencias observadas en el Sitio I y en el Sitio II que indicaran algún periodo determinado. La comparación entre los dos sitios considerando todos los datos, indicó que no hay diferencias significativas entre ellos tanto con la prueba de t como con la de MANOVA.

Al estimar las diferencias entre las dos especies con la prueba de t , sólo se pudieron observar con dosis superiores a 6 Gy. Sin embargo, para este tipo de estudios es importante considerar varios factores como la radiación y el tiempo, que fueron dos variables muy importantes en el presente estudio. Una prueba útil en este caso es la MANOVA o análisis multifactorial de varianza, cuyo resultado está basado en cuatro pruebas: Wilks'

Lambda, Pillai's Trace, Hotelling-Lauley y Roy's Max Root. Con esta prueba se determinó que la diferencia entre ambas especies en cada sitio es muy significativa ($p < 0.0001$) como se puede ver en la tabla 10 y en la figura 9 que *D. melanogaster* tiene una PE más alta que *D. simulans*.

Lo anterior destaca la importancia de hacer este tipo de estudios a largo plazo ya que como se puede observar cuando el análisis se hace por muestras, hay diferencias en algunas de ellas pero en otras no. Sin embargo, cuando se hace el análisis considerando todo el período de estudio, *D. melanogaster* tiene una viabilidad significativamente más alta que *D. simulans*, congruentes con los resultados de Palabost (1972), Marques (1973), Cordeiro *et al.* (1973), Parsons (1975) y Levine *et al.* (1989) quienes observaron que *D. melanogaster* tiene niveles de valores adaptativos superiores a los de *D. simulans*.

6.2.3. Comparación entre las etapas pre y operante de los reactores de la Central L.V.

Cuando se graficaron los resultados de la radiosensibilidad de ambas especies se observó que había dos fases en la curva resultante, en la primera los datos aumentan gradualmente en el periodo que incluye de 1987 a 1991 hasta alcanzar a la segunda en

donde aparentemente se estabiliza la PE de 1992 a 1997. Estas dos fases o etapas son más evidentes en el Sitio II debido a que el periodo de análisis es mayor. Sin embargo, también es posible observar este comportamiento con los resultados correspondientes al tratamiento con 8 Gy en las poblaciones del Sitio I (Figura 11). Por lo anterior se hizo un análisis matemático en dos partes, la primera para estimar el incremento anual de la PE ó viabilidad de la curva y la segunda para determinar el comportamiento de la radioresistencia mediante un modelo (Castillo y Pimentel 2000).

En la primera parte del análisis se puede observar que hay un aumento gradual de la resistencia a la radiación cuando los huevos son tratados con 4, 6 y 8 Gy de rayos gamma (Figura 10). Para calcular el incremento de la radioresistencia, se utilizó la ecuación de la recta $f(x) = mx + b$ cuyos valores están en la tabla 11.

De este cálculo se destaca que los coeficientes de correlación (r) son aceptables y van de 0.8283 a 0.9499 para *D. melanogaster* y de 0.5343 a 0.8254 para *D. simulans* y que el incremento de la PE es inversamente proporcional a la dosis utilizada, de 0.085 a 0.0163 para *D.*

melanogaster y de 0.083 a 0.014 para *D. simulans*. De nuevo estos datos indican que *D. melanogaster* tiene un incremento anual mayor que *D. simulans* lo que indica una diferencia más entre ambas especies. Este aumento gradual en la radioresistencia puede ser debida a que en el ambiente hay factores que lo perturban y que pueden ser los causantes de tal incremento.

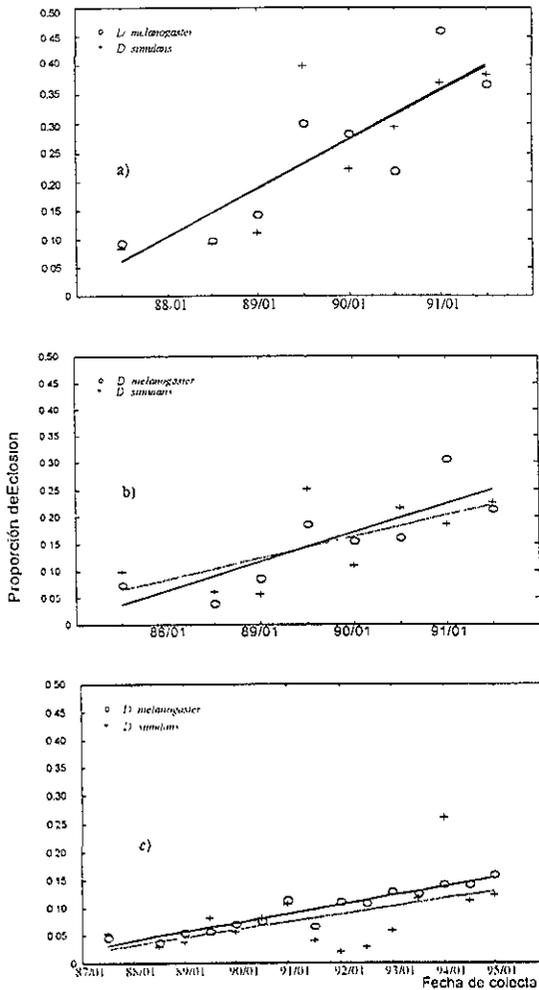


Figura 10 Relacion de la VHA respecto al tiempo de ambas especies del Sitio II despues de los tratamientos con a) 4, b) 6 y c) 8 Gy de rayos gamma

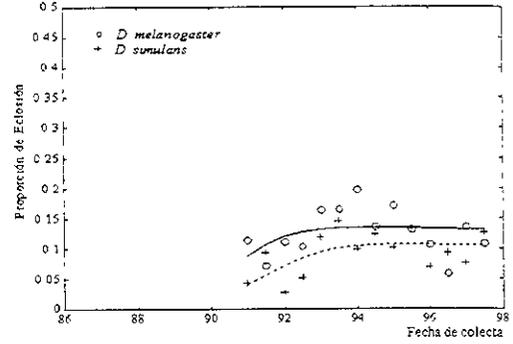


Figura 11. Curva calculada de la VHA del Sitio I de ambas especies después del tratamiento con 8 Gy

La segunda parte del análisis indicó que la radiosensibilidad tiene un comportamiento que se puede definir con la ecuación: $f(t) = \frac{1}{a + bc^t} \text{Sen}\left(\frac{d}{t}\right)$, en donde a , b , c y d son parámetros a determinar. Se encontró con el cálculo de los residuales que, a pesar de que los datos son dispersos (porque provienen de poblaciones naturales), tienen un comportamiento normal, es decir las desviaciones estándar están dentro del intervalo $\pm 2 \sigma$ y media cero. Los valores de los parámetros de las curvas de cada tratamiento se presentan en la tabla 12, de éstos destacan los r que para *D. melanogaster* van de 0.7324 a 0.8201 y para *D. simulans* de 0.4134 a 0.7156, lo que nos indica que con este modelo se define adecuadamente el comportamiento del efecto de la radiación gamma a través del tiempo de las dos especies (Figura 12) y se puede decir que de acuerdo a los r , *D.*

melanogaster es más estable que *D. simulans* como se vio en la figura 6.

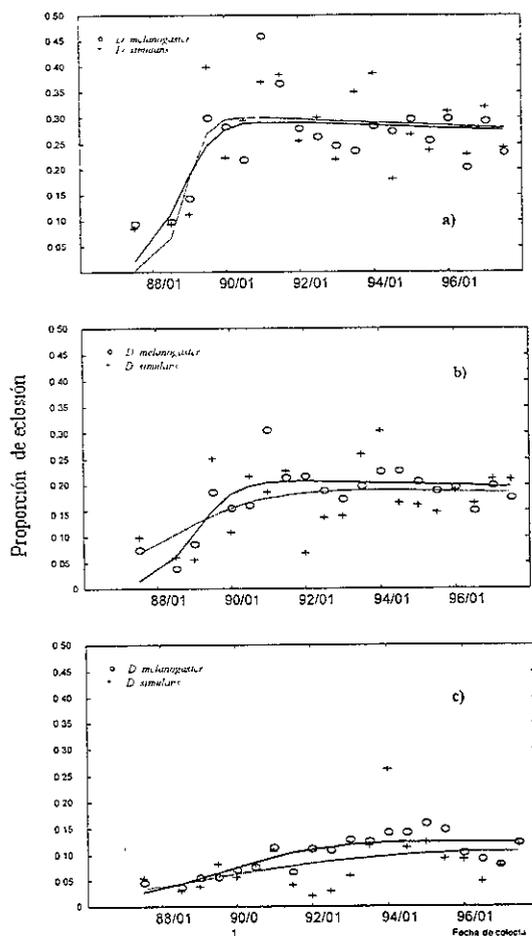


Figura 12. Curvas calculadas de la VHA de ambas especies después del tratamiento con. a) 4, b) 6 y c) 8 Gy del Sitio II

La comparación entre la etapa pre y la operante de los reactores indicó que hay un incremento anual de la resistencia a la radiación. El hecho de que esta tendencia haya ocurrido en un período particular en el que las unidades 1 y 2 iniciaron su funcionamiento (1989 y 1994, respectivamente) y que éste no se presente en los grupos testigos es de llamar la atención. Esto muestra que el incremento

observado no es al azar aunque los efluentes tanto líquidos como gaseosos están dentro de los límites permitidos (menos de 1 mrem). Esto permite elucidar que muy probablemente, en los alrededores de la planta estos niveles bajos de radiación tienen un impacto positivo en las poblaciones en estudio. No obstante, de acuerdo con el postulado de que toda cantidad de radiación produce algún efecto, se debe considerar la existencia de riesgo asociado con cualquier actividad que conlleve irradiación a bajo nivel, sin importar cuan baja sea la dosis. Sin embargo, basados en los resultados de esta investigación, las dosis bajas parecen no ser un riesgo. Existen suficientes evidencias de que las poblaciones naturales de *Drosophila* con una historia de exposición a rayos-X, desarrollan radioresistencia (Marques 1973, Cordeiro *et al.* 1973) y se adaptan a los efectos mutagénicos de este mismo tipo de radiación (Nothel 1983). La exposición a dosis bajas de radiación, estimulan mecanismos de defensa proporcionando una mejor adaptación a la radiación (Oliviera *et al.* 1984, Shadley y Wolff 1987, Wolff 1998). Entre las defensas que son inducidas por la exposición a bajas dosis de radiación X (0.25 a 0.5 Gy) está el

incremento de 30 a 90 % de la actividad enzimática del producto del gen *Sod* en varios órganos incluyendo medula ósea y cerebro de roedores de apenas unas semanas de edad. Lo mismo sucedió en el cerebro de conejos tratados con partículas alfa del radón a concentraciones de 14 a 18 kBq/l (Yamaoka *et al.* 1994).

En las Centrales de Hamaoko y Ohwi, Ichikawa (1981), hizo estudios de mutagénesis en *Tradescantia* y halló diferencias entre la etapa pre y la operante, en la primera observó la basal y en la segunda el aumento significativo de la frecuencia de mutaciones inducida en sitios predeterminado. Este resultado lo relacionó con los efluentes de las centrales. Los resultados de este trabajo también indicaron diferencias entre la etapa pre y operante. Presuntamente la Planta de Laguna Verde libera desechos radiactivos al ambiente que conllevan probablemente al aumento de la radiación de fondo local. No obstante, los resultados indican que la respuesta en ambos sitios es homogénea. El aumento gradual de la radioresistencia observada con el tratamiento con 8 Gy en ambos sitios indica que probablemente tal incremento de radiación de fondo tiene impacto en toda el área alrededor de la Planta.

No se puede descartar la posibilidad de que las diferencias entre las dos etapas de los reactores se deban a que en los primeros años hasta 1991 el área alrededor de la Planta estaba muy perturbada y que esto haya provocado que la VHA disminuyera y que en la medida en que se fue estabilizando el medio, este factor fuera alcanzando los niveles normales. Sin embargo, no se cuenta con datos para confirmar esta hipótesis.

6.2.4. Comparación entre temporadas

En la tabla 10 están acumulados los resultados correspondientes a la temporada de lluvias y secas. Siguiendo el orden, las comparaciones entre las PE de las especies respectivas de cada sitio indicaron en general que no hay diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos para cada temporada excepto en *D. melanogaster* del Sitio I con el tratamiento de 4 Gy y con *D. simulans* con el de 8 Gy del mismo sitio ($p < 0.05$). Sin embargo, hay que hacer notar que los promedios de las PE después de los tratamientos, son generalmente superiores en la temporada de secas como se presentó en los testigos, excepto con *D. simulans* (Tabla 5), es decir, el tratamiento con radiación no modificó el patrón descrito anteriormente lo que apoya la hipótesis de

que se trate de una adaptación a las condiciones de estrés de agua.

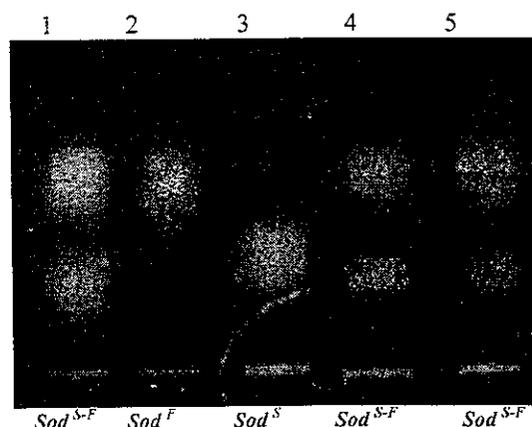
Para complementar el análisis anterior y tomando en cuenta todos los resultados de cada temporada se usó la prueba de MANOVA y el resultado indicó que las diferencias estacionales son estadísticamente significativas ($p < 0.0001$).

6.3. Frecuencias alélicas de SOD

En este punto se discuten los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas de la enzima superóxido dismutasa y su correlación con los efectos de los tratamientos.

Para analizar las frecuencias alélicas del locus *Sod*, se probaron de julio de 1996 a septiembre de 1998, 105 individuos de *D. melanogaster* y 179 de *D. simulans* del Sitio I y 123 de *D. melanogaster* y 248 de *D. simulans* del Sitio II. El análisis de las frecuencias del gen de la superóxido dismutasa se basó en el patrón de corrimiento de esta enzima SOD^S y SOD^F en gel de poliacrilamida (LKB Application 1977) con amortiguador tris borato a pH 9 según Ayala *et al.* (1972) (fotografía 1). La actividad se verificó mediante un procedimiento fotoquímico con una tinción

negativa descrito por Beauchamp y Fridovich (1971).



Fotografía 1 Patrón de corrimiento del gen de la *Sod* de *D. melanogaster* del laboratorio Carril 1 heterocigoto, Carril 2 homocigoto rápido, Carril 3 homocigoto lento, Carril 4 heterocigoto de *simulans* y Carril 5 heterocigoto de *melanogaster*

Los resultados de la frecuencias alélicas están en la tabla 13, así como la heterocigocidad. El análisis comparado entre las frecuencias de ambos alelos indicó que no hay diferencias entre ambos en cada población ni entre las especies de cada sitio y aunque en *D. melanogaster* del Sitio II parece elevada la presencia del alelo Sod^F , la diferencia no fue significativa. De acuerdo con la literatura estos resultados son congruentes, en el sentido de que en las poblaciones naturales las frecuencias de la variante F son generalmente más altas.

Por un lado, es importante hacer notar que casi el total de los individuos analizados fueron heterocigotos, como se puede constatar en la tabla 13 en donde están los resultados de las cuatro colectas que se analizaron y en las fotografías 2 de *D. melanogaster* y 3 de *D. simulans*. En el estudio que realizó Beckman (1973) con poblaciones humanas de Suecia, acerca del polimorfismo de la superóxido dismutasa del citosol o tipo A de células sanguíneas, cuyos alelos son *Sod*¹ y *Sod*² (Beckman *et al.* 1973), encontró con mayor frecuencia el fenotipo SOD¹ y en menor proporción el SOD². En un total de 4,411 individuos que analizó, sólo 48 fueron heterocigotos (*Sod*²⁻¹), pero concentrados en su mayoría en las regiones norteñas cuyas frecuencias fueron significativas de 1 a 3 % del resto. En general la presencia del alelo *Sod*² disminuyó hacia el sur. Beckman y Pakarinen (1973) también descubrieron que la frecuencia del alelo *Sod*² era mayor al norte de Finlandia y Suecia. Estos resultados pueden estar correlacionados con ciertos agentes selectivos propios del área. En este continente especialmente en el Norte, se han reportado altos niveles de radiación de fondo, esencialmente por radón (Jansson *et al.* 1989). Si consideramos que los alelos del gen *Sod*

humano son equivalentes a los de *Drosophila* en los que hay una eficiencia diferencial por atrapar los O₂⁻ (Lee *et al.* 1981b,) probablemente los hallazgos de Beckman (1973) tienen un significado importante para el presente estudio en el que se encontró una mayor proporción de heterocigotos en una región influenciada por una Central Nuclear.

Por otro lado, los resultados de las frecuencias alélicas del gen *Sod* encontrados en este estudio son congruentes con los de Beckman y Pakarinen (1973), Beckman (1973) y Beckman *et al.* (1973) quienes encontraron que el alelo *Sod*² cuyo producto tiene menor movilidad que el de *Sod*¹, es más raro al igual que el *Sod*^S de *Drosophila* y que las mayores frecuencias de individuos heterocigotos coinciden en las zonas con niveles altos de radiación de fondo.

Hudson *et al.* (1994) estimaron las frecuencias alélicas de gen *Sod*^S de *D. melanogaster* en dos localidades de California, una de ellas es El Rio y la otra Culver City que están separadas por 650 km, de distancia. Encontraron que estas cambiaron de un año a otro de 0.05 a 0.18. En El Rio las frecuencias cambiaron significativamente de 0.127 en 1984 a

0.051 en 1991. Lo mismo ocurrió Culver City, de 0.176 en 1988 a 0.076 en 1991 es decir, hubo disminución significativa de las frecuencias del alelo *Sod^S* con respecto al tiempo en ambas localidades. Adicionalmente observaron que las secuencias del alelo *Sod^S* de las distintas localidades son idénticas, en cambio las del *Sod^F* tienen variabilidad alta. En el presente estudio no se encontraron diferencias entre las frecuencias de los alelos *Sod^S* y *Sod^F*. No obstante, si se notó menor proporción del fenotipo SOD^S con respecto a SOD^F, aunque no significativamente.

En los reportes mencionados anteriormente y en las observaciones de esta investigación, está implícito que no hay un equilibrio entre las frecuencias esperadas de ambos alelos en la naturaleza según el equilibrio de Hardy-Weinberg (1: 2: 1). En las poblaciones de *Drosophila* de Laguna Verde se observó que hay una tendencia a favor del heterocigoto, es decir hay polimorfismo pero probablemente con selección natural en contra de los homocigotos. (Tabla 13), lo que sugiere fuertemente la existencia de factores propios del entorno que influyan sobre las frecuencias de este gen.

Debido a que es muy poca la literatura relacionada con el gen *Sod* para poblaciones naturales tropicales, se dificulta dar una explicación sustentada. No obstante, es posible suponer que la elevada presencia de heterocigotos en estas poblaciones tropicales sea debida a que en esta localidad las condiciones ambientales tales como la temperatura y la radiación solar son factores que influyen para la selección de genes que a su vez permiten la adaptación de *D. melanogaster* y *D. simulans* a tales condiciones ambientales. Considerando que en esta localidad está la Central Nucleoeléctrica que presuntamente podría incrementar la radiación de fondo provocando teóricamente que las poblaciones aledañas se sometan a estrés oxidante y por consiguiente se estimule la síntesis de enzimas protectoras tales como la SOD (Peng *et al.* 1986). Esta enzima como ya se mencionó tiene dos formas funcionales de las que SOD^S tiene 2.7 veces más eficacia que la SOD^F (Lee *et al.* 1981b), entonces se podría establecer la siguiente hipótesis: si SOD protege el ADN de las poblaciones aquí estudiadas contra los efectos de los EOR generados por la radiación ionizante, es más conveniente para las poblaciones sintetizar el producto de ambos alelos y garantizar mayor

cantidad de la enzima y de esta manera proporcionaría una ventaja adaptativa para atrapar la presunta alta concentración de superóxidos que se generan como producto del estrés. Así, ante situaciones con elevadas cantidades de EOR la expresión de ambos alelos confiere ventajas a los heterocigotos lo que incidiría en las frecuencias alélicas, mismas que pueden ser cuantificadas después de cierto tiempo.

Se han hecho estudios sobre la inducción de la actividad enzimática y la transcripción del gen *Sod* en respuesta a dosis bajas de exposición con rayos-X y se encontró que en fetos de roedores que la irradiación induce mRNA de *Sod* responsable de la actividad enzimática de SOD inducida. Cuando los EOR son incrementados por rayos-X, se estimulan al gen Cu-Zn *Sod* y la resistencia contra el O_2^- activo puede incrementarse. No se conoce cual es el mecanismo molecular involucrado en este proceso, pero se sabe que hay un intervalo de tiempo entre la inducción de mRNA y el incremento de la actividad enzimática de SOD. Estos hallazgos concuerdan con observaciones previas de la inducción de proteínas por rayos-X en células de melanoma radioresistentes y otros cambios observados en la expresión de genes humanos (Yamaoka *et al.* 1994).

Igual que con el análisis de la radiosensibilidad, no se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas de ambos sitios, por la misma razón, se puede suponer que se trate de una sola población (Sitio I y II).

Es interesante destacar que la comparación del comportamiento de la VHA con la radiosensibilidad (Figuras 12 y 13) en los diez años de estudio se notó que era muy diferente, ya que como se ha discutido, en el primer caso sólo se observaron variaciones estacionales. Rockwell *et al.* (1991) con las mismas poblaciones de Laguna Verde encontraron que la resistencia a la desecación en los primeros años de colecta (1986-1991) era consistentemente estable. Lo mismo ocurrió en la actividad de desplazamiento sólo se notó que *D. melanogaster* tiene valores significativamente superiores a los de *D. simulans*, al igual que en el presente estudio (Olvera *et al.* 1993). En el caso de la radiosensibilidad, en los primeros años se observó un incremento significativo de la resistencia a la radiación. El hecho de que este resultado sólo se presentó con el estudio de la radiosensibilidad de las moscas, sugiere que probablemente se deba a un factor relacionado con radiación. No obstante, no hay una correlación simple

entre esta característica y los efluentes de la planta.

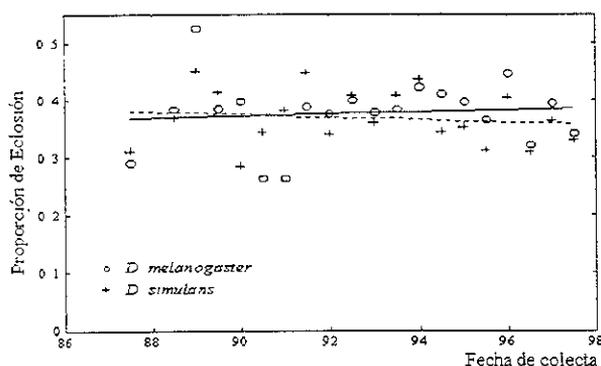


Figura 13 Tendencia de la proporción de eclosión de las especies del Sitio II.

6.4. Posibles factores contribuyentes a la resistencia a la radiación

Se ha considerado la existencia de factores en el ambiente como pesticidas (fungicidas, insecticidas y herbicidas), contaminación por combustión, lluvia radiactiva debido a pruebas nucleares y radioactividad natural (radiación de fondo), además de los radionúclidos presuntamente liberados por las plantas nucleares. Los parámetros climatológicos podrían tener efectos en la intensidad de estos factores.

Cabe mencionar que en 5 km a la redonda de la Central no hay zonas de cultivo, lugares donde se utilizan principalmente los pesticidas. Desde antes de la construcción de la planta los terrenos se han transformado en pastizales para la actividad ganadera. Por otro lado, las moscas de este

género sólo tienen actividades de dispersión cuando el nicho deja de proveerles alimento, especialmente frutos (Bateman 1972) pero en esta área existen manglares y árboles frutales que constantemente los producen, por lo que se podría suponer que no están expuestas a pesticidas que pudieran relacionarse con el aumento de la resistencia a la radiación.

La contaminación por combustión es directamente proporcional al tráfico de las zonas. La carretera Veracruz - Palmasola no contribuye prácticamente en la contaminación de este tipo, porque el poco humo generado es rápidamente dispersados por los vientos característicos de la costa por lo que se considera irrelevante su contribución. Por otro lado, debido a que no hay industria cerca de la planta esencialmente no existe contaminación industrial.

Es bien conocido que la lluvia radiactiva y la radiación de fondo incrementan después de la temporada de lluvias (Ichikawa 1981). De esta manera la correlación de los datos de la radiosensibilidad con la precipitación no es simple, aparentemente en los primeros años no hay una clara diferencia entre la temporada de secas y de lluvias hasta 1991. No obstante, la

dispersión y la resistencia a la sequía no se relacionan con este elemento climático por esta razón. los cambios periódicos de la resistencia a la radiación son probablemente debidos a la radiación de fondo.

Ichikawa (1981) encontró que la frecuencia de mutaciones no está relacionada con las variaciones de la temperatura, por lo que concluye que no fueron las causantes del incremento significativo de las mutaciones. En el presente estudio la relación con la temperatura tampoco es sencilla. Sin embargo, parece que los resultados de la radiosensibilidad no tienen relación con este parámetro.

Con respecto a los vientos predominantes no se evidenció relación alguna ya que no hubo diferencias entre ambos sitios lo que indicó que se trata de una sola población por estar sometida a las mismos factores tanto ambientales naturales como antropogénicos.

Los resultados más relevantes de esta investigación son: el incremento gradual de la resistencia a la radiación y la presencia de frecuencias altas de individuos heterocigotos para el gen *Sod* en comparación con la resistencia a la sequía y a la capacidad de desplazamiento estudiadas

con las mismas poblaciones en los que no se observaron cambios a través del tiempo y con lo que se podría concluir que en la zona de la Central Laguna Verde hay factores en el ambiente que contribuyen en el aumento de la resistencia a la radiación de *D. melanogaster* y *D. simulans*.

Ichikawa (1981) considerando que en *Tradescantia* los máximos efectos genéticos del tratamiento mutagénico aparecen después de los 12 días de la exposición mostrando una buena coincidencia con el período de prueba de los reactores concluye que la planta ciertamente podría descargar algunos factores mutagénicos durante estos períodos en el reactor de Hamaoka y el de Yakahama. Comparativamente en la Central de Laguna Verde desde octubre de 1988 hay material radiactivo para utilizarse como combustible para la generación de electricidad, lo que no descarta la posibilidad de que influya sobre el ambiente de la zona que a su vez podría contribuir en el aumento de la resistencia a la radiación de las poblaciones en estudio.

Los factores causantes de mutaciones, como los que son descargados de las plantas Nucleoeléctricas tipo BWR fabricados por la General Electric, son por

supuesto sustancias radiactivas gaseosas. Estas son predominantemente gases raros radioactivos tales como Kr^{85} y el Xe^{133} que son extraídos después de pasar por un filtro de carbón. El Kr^{85} que tiene una vida media de 10.3 años, es el principal componente. Además de estos gases raros, el I^{131} con una vida media de 8.05 días es descargado a una tasa de 10^{-3} a 10^{-4} de los gases raros y es muy importante desde un punto de vista biológico, debido a que se concentra del aire en los tejidos de las plantas y en la tiroides de hombre con un factor extremadamente alto, del orden de 10^6 a 10^7 (Soldat 1963, Nauman *et al.* 1979), el tritio (H^3) de 12.3 años de vida media, el Co^{60} de 5.27 años, el Mn^{54} de 278 días y muchos otros son también liberados al ambiente junto con los dos radionúclidos primero mencionados. No obstante, correlacionar los niveles de radiación ambientales monitoreados con nuestros resultados es difícil, máxime que los detectores termoluminiscentes (TLD) u otros instrumentos físicos detectan sólo una parte

menor de los niveles de radiación ambiental, la radiación gamma y por consiguiente una parte menor de la dosis absorbida (externa e interna) en tejidos biológicos.

Los incrementos en la frecuencia de mutaciones monitoreadas por Ichikawa (1981) los atribuyó al Yodo 131 provenientes de las plantas nucleares de Hamaoka, Takahama, Tokai y Ohwi debido a su alto factor de concentración en el aire (10^6 a 10^7) y a su adsorción en los tejidos de las plantas.

En nuestro caso, aunque no se puede hacer una clara determinación de las causas específicas del incremento de la resistencia a la radiación y la alta frecuencia de individuos heterocigotos para el gen *Sod* alrededor de la planta, las correlaciones con su operación sugieren que es una de las principales fuentes distribuidoras de modificadores no específicos de estas características biológicas.

7. CONCLUSIONES

1. La viabilidad huevo-adulto de *Drosophila melanogaster* es significativamente superior a la de *D. simulans*.
2. De acuerdo con el modelo utilizado, el comportamiento de la viabilidad huevo-adulto es sinusoidal con una periodicidad aproximada de tres años para ambas especies en las que se presentó alternancia de la proporción de eclosión con relación a las temporadas de lluvias y secas.
3. Las frecuencias de los alelos del gen *Sod* para ambas especies son iguales; la condición que prevalece es la de heterocigocidad.
4. Durante el período de estudio en ambas especies la resistencia a la radiación se favoreció.
5. Las moscas que habitan en los sitios muestreados, constituyen una sola población.
6. Es necesario continuar el estudio a largo plazo para poder estimar el papel adaptativo del gen *Sod* en las poblaciones de *Drosophila* de Laguna Verde, Veracruz, México.
7. Tomando en cuenta todos los resultados, se puede concluir que el funcionamiento de los reactores no ha tenido impacto negativo o perjudicial sobre *D. melanogaster* ni *D. simulans*.

8. REFERENCIAS

- Arena, V. (1971). Ionizing radiation and life. The C.V. Mosby Company. Saint Luis. pp 301-308
- Asdams, M. D. *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287:2185-2191.
- Auerbach, C. (1976) Some old problems in mutagenesis and their bearing on mutagen testing. Mutat. Res. 41:3-6.
- Ayala, F. J. (1966). Evolution of fitness. V. Improvement in the productivity and size of irradiated population of *Drosophila serrata* and *Drosophila birchii*. Genetics 53: 893-895.
- Ayala, F.J. (1969). An evolutionary dilemma: Fitness of genotypes versus fitness of populations. Canad. J. Cytol. Gen. 11:439-459.
- Ayala, F.J.; Powell J.R.; Tracey, M.L.; Mourao C.A. y Pérez, S. (1972). Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. Genetics 70: 113-139.
- Azzam, E. I.; de Toledo, S. N.; Raphorst, G. E. y Mitchel, L. R. E. J. (1992) Radiation induced radioresistance in a normal human skin fibroblast cell line. En: low dose irradiation and biological defense mechanisms (Eds) Sugahara T. Sagan, L.A., Aoyama, T. Ed. Amsterdam Elsevier. pp 291-294.
- Bateman, M.A. (1972). The ecology of fruit flies. Aust. J. Zool. 6037: 493-519.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analyt. Biochem. 44: 276-287.
- Beckman, G. (1973). Population studies in northern Sweden. VI. Polymorphism of superoxide dismutase. Hereditas 73: 305-310.
- Beckman, G.; Beckman, L. y Nilsson, L.O. (1973). A rare homozygous phenotype of superoxide dismutase. SOD 2. Hereditas 75: 138-139.
- Beckman, G. y Pakarinen, A. (1973). Superoxide dismutase. A population study. Human Heredity 23: 346-351.
- BEIR (1980). Committee on the biological effects of ionizing radiation. The effects on populations of exposure to low levels of ionizing radiation. National Academy Press. Washington, D.C. 524 p.
- Blaylock, B.G. y Shugart, H.H. (1972). The effect of radiation induced mutations on the fitness of *Drosophila* population. Genetics 72: 449-474.
- Boothman, D.A.; Meywrs, M.; Fukunaga, N. y Lee., S.W. (1992) Isolation of X-ray-inducible transcripts from radioresistant human melanoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7200-7204.
- Boreham, D.R. y Mitchel, R.E. (1991). DNA lesions that signal the induction of radioresistance and DNA repair in yeas. Radiat. Res. 128: 19-28.
- Bossi, A. y Olivieri, G. (1989) Variability of the adaptive response to ionizing radiation in humans. Mutation Res. 211:13-17.
- Cai, L. y Liu, S. Z. (1990). Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cell *in vivo* and *in vitro* by low-dose X-irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 58:187-194.
- Campbell, S. D.; Hilliker, S.A. y Phillips, J.P. (1986). Cytogenetic analysis of the cSOD microregion in *Drosophila melanogaster*. Genetics 112: 205-215.
- Castillo, M.J.A. y Pimentel, A.E. (2000). Un modelo matemático para el comportamiento de la viabilidad huevo-adulto de *D. melanogaster* y *D. simulans* d Laguna Verde, Veracruz. Informe Interno. ININ. IT.GCA/DFC-001/00. 32 pp.
- Choudhary, M. y Singh, R.S. (1987). A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. III. Variations in genetic structure and their causes between *Drosophila melanogaster* and its sibling species *Drosophila simulans* Genetics 117: 697-710.

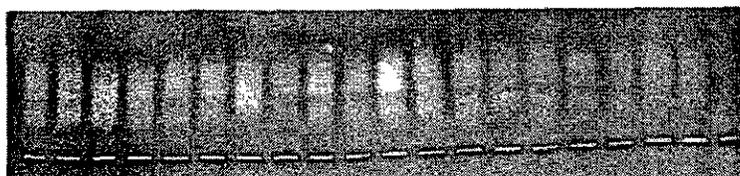
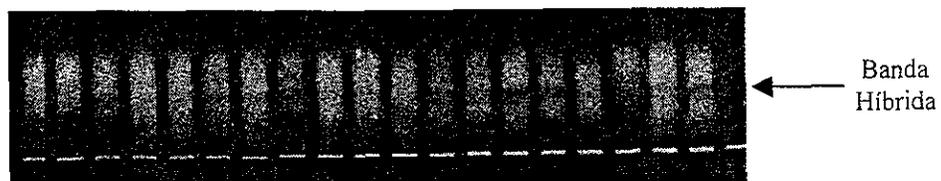
- Christman, M.; Morgan, R.W.; Jacobson F.S. y Ames, B.N. (1985). Positive control of a regulon for defense against oxidative stress and some heat-shock proteins, in *Salmonella typhimurium*. Cell 41:753-762.
- CNS (1987). CONSEJO DE SEGURIDAD NUCLEAR. Radiación, Dosis, Efectos. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Madrid, España. 64 p.
- Contreras, A.; Jorge, C.; Vázquez, L.C.; Mancilla, R.; Pérez, J. y Alvarez, O (1995). Campo de vientos alrededor de Laguna Verde y modelos realistas de dispersión atmosférica. Reporte 1. Est. Cen. Laguna Verde. Anexo 1 pp 12.
- Cordeiro, A.R.; Marques, E.K. y Veiga-Neto, A.J. (1973). Radioresistance of natural population of *Drosophila willistoni* living in a radioactive environment. Mutat. Res. 19: 325-329.
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis- II Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404-427
- Demple, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. Ann. Rev. Genet. 25:315-337.
- Dobzhansky, Th. (1971). Evolutionary oscillations in *Drosophila pseudoobscura*. En: Ecological genetics and evolution. R. Creed Eds, Blackwell, Oxford.
- Fleming, J.E.; Shibuya, R.B. y Bansch, K.G. (1987). Lifespan, oxygen consumption and hydroxyl radical scavenging capacity of two strains of *Drosophila melanogaster*. Age 10: 86-89.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. Science 21: 875-880.
- Fridovich, I. (1983). Adv. Enzymol. 58: 61-97.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutase. Ann. Rev. Biochem. 64: 97-112.
- Fritz, N.H. y Schaeppi, B.C. (1991). Adaptive response to dominant lethality of nature (class A) and immature (class B) oocytes of *D. melanogaster* to low dose of ionizing radiation: effects in repair-proficient (*yw*) and repair-deficient strains (*mei-41^{D5}* and *mus 302^{D1}*). Int. J. Radiat Biol 59:175-184.
- Gille, G. y Sigler, K. (1995). Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol. 40:131-152.
- Godbold, D.L.; Feig, R.; Cremer, H.A. y Hutterman, A. (1993). Determination of stress bioindicators in three Norway spruce stands in Northern Germany. Water, Air Soil Pollut. 66: 231-237
- Godon, C.; Lagniel, G.; Lee, J. Buhler, J.M.; Kieffer, S., Perrot, M.; Boucherie, H.; Toledano, M.B. y Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Sacharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 273: 22480-22489
- Halffter, G. y Reyes, P. (1975). Análisis cuantitativo de la fauna de artrópodos de Laguna Verde, Veracruz. Folia Entomol. Mexicana 30: 3-29
- Harman, D. (1981). The aging process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 7124-7128.
- Hassan, H.M. y Scandalios, J.G. (1990). Superoxide dismutases in aerobic organisms, en: Alscher, R.G. y Cumming, J.R. (Eds). Stress Responses in plants: Adaptation and Acclimatation Mechanisms. Wiley-Liss. N.Y. pp 175-199.
- Heindorff, K.; Rieger, R.; Schubert, I.; Michaelis, A. y Aurich, O. (1987). Clastogenic adaptation of plant cell – reduction of the yield of clastogen-induced chromatid aberrations by various pretreatment procedures,. Mutat. Res. 181: 157-171.
- Hellawell, J.M. (1991). Development of a rationale for monitoring. En: Monitoring for conservation and ecology. Eds. Goldsmith Barrier. Chapman and Hall 1:1-32.
- Hoffmann, A.A. (1987). A laboratory study of male territoriality in the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. Anim. Behav. 35: 807-818.
- Hoffmann, A.A. y Watson, M. (1993) Geographical variation in the acclimation responses of *Drosophila* to temperature extremes. Amer. Nat. Supplement 142:93-113.

- Hubby, J. L. y Throckmorton, L. H. (1968). Protein differences in *Drosophila*. IV. A study of sibling species. *Amr. Nat.* 102: 193-205.
- Hudson, R.R.; Bailey, K.; Skarecky, D. Kwiatowski, J. y Ayala, F.J. (1994) Evidence for positive selection in the superoxide dismutase (Sod) region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136:1329-1340
- Ichikawa, S. (1981). *In situ* monitoring with *Tradescantia* around nuclear power plants. *Environmental Health Perspect.* 37:145-164.
- Ikushima, T. (1995). Radio-adaptive response: enhanced repair of radiation-induced DNA strand breaks in adapted cells. in ; U. Hagen. H., y Streffer, C. (Eds). *Radiat. Res.* 1985-1995. 306 p.
- Jansson, B.; Tholander, M. y Axelson O. (1989). Exposure to radon in Swedish dwellings-attitudes and elimination. *Environ. Int.* 15: 293-297.
- Jeeves, W. P. y Rainbow, A.J. (1983). U.V. enhanced reactivation of U.V. and gamma-irradiated adenovirus in normal human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 43: 599-623.
- Joiner, M.C; Lambin P.; Malaise, E.P.; Robson T.; Arrand J.E; Skov, K.A y B. Marples. (1996). Hypersensitivity to very low single radiation dose: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat. Res.* 358:171-183.
- Kirkland, K.C. y Phillips, J.P. (1987). Isolation and chromosomal localization of genomic DNA sequences coding for the cytoplasmic superoxide dismutase from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 61:415-419.
- Kovalchuk, I; Kovalchuk, O; Arkhipov, A. y Hohn, B. (1998). Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobyl accident. *Nat. Biotechnol.* 16: 1054-1057.
- Kovalchuk, O.; Kovalchuk, I.; Titov, V.; Arkhipov y Hohn, B.(1999). Radiation hazard caused by the Chernobyl accident in inhabited areas of Ukraine be monitored by transgenic plants. *Mutat. Res.* 446:49-55.
- Lambin, P.; Marples, B.; Fertil, B.; Malaise, E. P y Joiner, M. C. (1993). Hypersensitive of a human tumor cell line to very low radiation doses. *Int. J. Radiat. Biol.* 63:639-650.
- Leccia, M.T.; Richard, M.J.; Beani, J.C.; Faure, H.; Monjo, A.M.; Amblard, P. y Favier, A. (1993). *Photochem. Photobiol.* 58:548-553.
- Lehninger, A. L. (1982). *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular.* Omega, Cuarta Ed., 514 p.
- Lee, Y.M.; Misra, H. P. y Ayala, F.J. (1981a). Superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster*. Biochemical and structural characterization of allozyme variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 7052-7055.
- Lee, Y.M; Ayala F.J. y Misra H.P. (1981b). Purification and properties of superoxide dismutase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 256:8506-8509.
- Lee, Y.M.; Friedman, D.J. y Ayala, F.J. (1985). Complete amino acid sequence of copper-zinc superoxide dismutase from *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.* 241: 577-589.
- Levine, L.; Olvera, O.; Rockwell, F.L.; De la Rosa, M.E. y Guzmán, J. (1989). Nuclear power and natural populations of Mexican *Drosophila*. *Genome* 31:256-264.
- LKB Application (1977). Note 306. SDS and conventional polyacrylamide gel electrophoresis with LKB 2117 Multiphor. *Analytical protein separation.* 1-15.
- Mckenzie, J.A. (1978). The effect of developmental temperature on population flexibility in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Aust. J. Zool.* 26: 105-112.
- Mckenzie, J. A. y Parsons, P.A. (1974). The genetic architecture of resistance to desiccation of populations of *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 27, 441-456.
- Magnien, E., Dalschaert, X. y Coppola, M. (1981). Dose effect relationships, r.b.e. and split-dose effects after gamma-ray and fast neutron irradiation of protoplasts from wild *Nicotiana* species. *Int. J. Radiat. Biol.* 40:463-474.

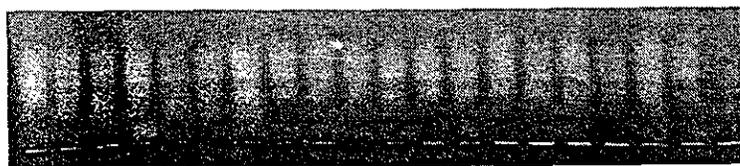
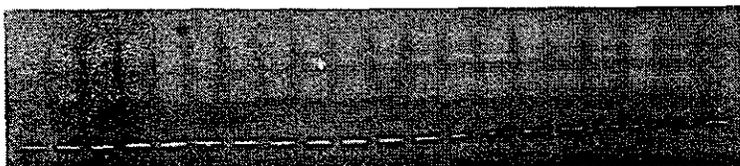
- Marples, B.; Lam, G. K.; Zhou, H. y Skov, K. A. (1994). The response of chinese hamster V79-379 A cells exposed to negative pi-mesons: evidence that increased radioresistance is dependent on linear energy transfer. *Radiat. Res.* 138:S81-S84.
- Marples, B. y Joiner, M. C. (1995). The elimination of low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with X-rays or hydrogen peroxide. *Radiat. Res.* 141: 160-169.
- Marques, E.K. (1973). The development of radioresistance in irradiated *Drosophila nebulosa* population. *Mutat. Res.* 17: 59-72.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- Meneghini, R.; Martins, E.A.L. y Calderaro, M. (1993). DNA damage by reactive oxygen species. The role of metals. *Free Radicals: From basic science to medicine*. Poli, G. Albano, E. Y Dianzani M.U. (Eds.) BirK-Häuse Barlag/Switzerland. pp 102-112.
- Meyers, M.; Shea, R.A.; Petrowski, A.E.; Seabury, H.; McLaughlin, P.W.; Lee, I.; Lee, S.W. y Boothman, D.A. (1992). Role of X-ray-inducible genes and proteins in adaptive survival responses. In: *Low doses Irradiation a Biological Defense Mechanisms* (Sugahara, T.; Sagan, L.A. y Aoyama, T. Eds.). Amsterdam: Elsevier, pp 263-266
- Mitchel, R.E. y Morrison, D.P.(1987). Inducible DNA-repair systems in yeast: competition for lesions. *Mutat. Res.* 183: 149-159.
- Moore, M.N.; Lowe, D.M.; Livingstone, D.R. y Dixon, D.R. (1986). Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. *Wat. Sci. Tech.* 18: 223-232.
- Nauman, C.H.; Klotz, P.J. y Schairer, L.A. (1979). Uptake of tritiated 1,2-dibromoethane by *Tradescantia* floral tissues: relation to induced mutation frequency in stamen hair cells. *Environ. Exptl. Bot.* 19: 201.
- Nothel, H. (1983). Investigations on radiosensitive and radioresistant populations of *Drosophila melanogaster*. XVI. Adaptation to the mutagenic effects of X-rays in several experimental populations with irradiation histories. *Mutat. Res.* 111: 325-340.
- Ohnishi, S. (1979). Relationship between larval feeding behavior and viability in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* *Behav. Genet.* 9: 129-134.
- Olivieri, G.; Bodycote, J. y Wolff, S.(1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223:594-597.
- Olvera, R.O.; Rockwell, R.F.; de la Rosa, M.E.; Guzmán, R.J.; Laverde, M.J. y Levine, L. (1993). Studies of sibling *Drosophila* species from Laguna Verde, Veracruz, México. V. Temporal stability in dispersive behavior.
- Orr, W.C. y Sohal, R.S. (1993). Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 34-40.
- Palabost, L. (1972). The influence of density on the larval viability of *Drosophila melanogaster*. *DIS.* 49: 118.
- Parsons, P.A.; Macbean, I.T. y Lee, B.T.O. (1969). Polymorphism in natural populations for genes controlling radioresistance in *Drosophila*. *Genetics.* 61: 211-218.
- Parsons, P.A. (1975). Differences between *Drosophila melanogaster* and its sibling species *D. simulans* to radioresistance using isofemale strains from natural population. *Int. J. Radiat. Biol.* 27: 297-300.
- Patra, J.; Panda, K. K. y Panda, B.B. (1997). Differential induction of adaptive responses by paraquat and hydrogen peroxide against the genotoxicity of methyl mercuric chloride, maleic hydrazide and ethyl methane sulfonate in plant cells in vivo. *Mutat. Res.* 393:215-222.
- Peng, T. X.; Moya, A. y Ayala, F.J., (1986). Irradiation resistance conferred by superoxide dismutase: Possible adaptive role of a natural polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:684-687.

- Puchta, H.; Swoboda, P.; Gal, S.; Blot, M. y Hohn, B. (1995). Somatic intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant. Mol. Biol.* 28:281-292.
- Rieger, R. y Michaelis A. (1993). Combined application of MH and TEM for conditioning treatment simultaneously triggers two protective functions against induction of chromatid aberrations in *Vicia faba* root tip meristem cells. *Mutat. Res.* 302:161-164.
- Rieger, R.; Michaelis A. y Nicolof, H. (1982). Inducible repair processes in plant root tip meristems? 'Below-additivity effects' of unequally fractionated clastogen concentrations, *Biol. Zbl.*, 101: 125-138.
- Rieger, R.; Michaelis A. y Nicolof, H. (1984). Clastogenic adaptation of the *Vicia faba* root tip meristems as affected by various treatment parameters. *Mutat. Res.* 140:99-102.
- Rieger, R.; Michaelis A. y Nicolof, H. (1986). Effects of stress factors on the clastogen response of *Vicia faba* root tip meristems: "Clastogenic adaptation". *Biol. Zbl.* 105:19-28.
- Riley, P.A. (1994). Free radicals in biology: Oxidative stress and effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 27-33.
- Rockwell, R.F.; Rosa de la M.E.; Guzmán, J.; Laverde, M.J.; Levine, L. y Olvera, O. (1991). A temporal study of desiccation resistance of sibling *Drosophila* species from Laguna Verde, Veracruz, México. *Am. Midl. Nat.* 126:338-344.
- Rohilla, Y. y Singh, K.P. (1992). Positron annihilation studies in lysozyme and catalasa. *Indian J. Biochem. Biophys.* 29:465-468.
- Rosa de la, M.E.; Guzmán, J.; Levine L.; Olvera, O. y Rockwell, R.F. (1989a). Studies of sibling *Drosophila* species from Lagoon Verde, Ver. México. I. Species frequencies, viability, desiccation resistance and vagility. *J. Hered.* 80: 44-77.
- Rosa de la, M.E.; Guzmán, J.; Levine L.; Olvera, O. y Rockwell, R.F. (1989b). Studies of sibling *Drosophila* species from Laguna Verde, Ver. México. II. Effect of radiation on viability. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 5:65-70.
- Rosen, D.R.; Siddique, T.; Paterson, D.; Figlewicz, D.A. y Sapp, P. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62.
- Samson, L. y Cairns, J. (1977). A new Pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* 267: 281-283
- Samson, L. y Schwartz, J.L. (1980). Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human in fibroblast cell lines. *Nature* 287:861-863.
- Sankaranarayanan, K. (1965). Further data on the genetic load in irradiated populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 52: 152-164.
- Sankaranarayanan, K.; Duyn, A.V.; Loos M.J. y Natarajan A. T. (1989). Adaptive response of human lymphocytes to a low level radiation from radioisotopes or x-ray, *Mutat. Res.* 211:7-12.
- Schappi, B.C. (1994). On the genetic background of the adaptive response to X-rays in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Radiat. Biol.* 63: 427-435.
- Schnebel, E.M. y Grossfield, J. (1983). A comparison of span characteristics in *Drosophila*. *Exp. Geront.* 18: 325-337.
- Seto N.O.L.; Hayashi, S. y Tener, G.M. (1987). *Drosophila* Cu-Zn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 15:5483.
- Seto, N. O. L.; Hayashi, S. y Tener, G. M. (1989). Cloning, sequence analysis and chromosomal localization of the Cu-Zn superoxide dismutase gene of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 75: 85-92.
- Shadley, J.D.; Afzal, V. y Wolff, S. (1987). Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X-rays to human lymphocytes. *Radiat. Res.* 111:511-517.
- Shadley, J.D. y Wolff, S. (1987). Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2:95-96.

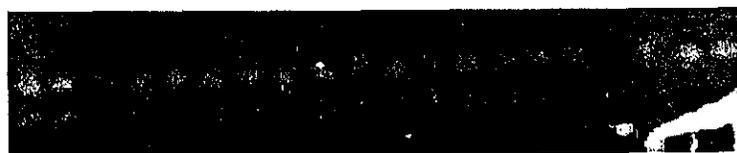
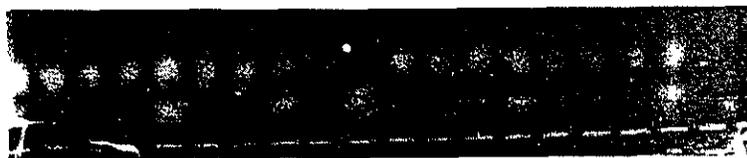
- Singh, R.K.; Chandra, P.; Singh, J. y Singh, D.N. (1993). Effect of gamma-ray on physion-biochemical parameters of sugar cañe. *J. Nuc. Aric. Biology.* 22:65-69.
- Soldat, J.K. (1963). The relationship between ¹³¹I concentrations in various environmental samples. *Health Phys.* 9. 1167.
- Sparrow, A.H.; Schairer, L.A. y Villalobos-Pietrini, R. (1974). Comparison of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. *Mutat. Res.* 26: 263-276.
- Sparrow, A. H.; Underbrink, A. G. y Rossi, H.H. (1972). Mutation induced in *Tradescantia* by small dose of X-rays and neutrons: analysis of dose-response curves. *Science*, 176:916-918.
- Swoboda, P.; Gal, S., Hohn, B. y Puchta, H. (1994). Intrachromosomal homologous recombination in whole plants, *EMBO J.* 13:484-489.
-
- Takahashi, C.S. e Ichikawa, S. (1976). Variation of spontaneous mutation frequency in *Tradescantia* stamen hairs under natural and controlled environmental conditions. *Environ. Exptl. Bot.* 16: 287.
- Tolmasoff, J.M.; Ono, T. y Cutle, R.G. (1980). Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. USA.* 77: 2777-2781.
- UNSCEAR. (1994). United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly, With Annexes. Sources and Effects of Ionizing Radiation. N. Y.: United Nations.
- Upton, A.C. (1982). Radiaciones ionizantes de bajo nivel y sus efectos biológicos. *Inv. y Ciencia.* 67: 6-15
- Wallace, B. (1956). Studies on irradiated populations of *D. melanogaster*. *J. Genet* 54: 280-293.
- Weisiger, R.A. y Fridovich, I. (1971). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intermitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248: 4793-4796.
- Wiencke, J. K.; Afzal, V.; Olivieri, G. y Wolff, S. (1986). Evidence that the (³H) thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent dose of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis* 1:375-380.
- Wolff, F.S (1992). Failla Memorial Lecture. Is radiation all bad? The search for adaptation *Radiat. Res.* 131: 117-123
- Wolff, S. (1998). The adaptive response in radiobiology: Evolving insights and implications. *Environ. Health Perspecti.*, 106 Sup.1:277-283.
- Wolff, F.S.; Jostes, R.; Cross, F.T.; Hui, T.E.; Afsal, V. y Wiencke J.K. (1991). Adaptive response of human lymphocytes for the repair of radon-induced chromosomal damage. *Mutat. Res.* 250: 299-306.
- Yamaoka, K.; Sato, E.F. y Utsumi, K. (1994). Induction of two species of superoxide dismutase in some organs of rats by low doses X-irradiation. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* 26: 205-214.
- Youngblom, J.H.; Wiencke, J.K. y Wolff, S. (1989). Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Mutat. Res.* 227:257-261.
- Zhang-Chaomei. (1993). Radiation-induced changes in enzymes of wheat during seed germination and seedling growth. *Act. Agric. Nucleate Sinica* 7:93-97.



Fotografía 2 Patrón de corrimiento de la superóxido dismutasa de *Drosophila melanogaster* donde destaca la banda híbrida



Fotografía 3 Patrón de corrimiento de la superóxido dismutasa de *Drosophila simulans* donde destaca la banda híbrida



Fotografía 4. Características del patrón de corrimiento de la SOD concentrada

Tabla 1. Proporción de eclosión de *D. melanogaster* y *D. simulans* de los Sitios I y II, después de los tratamientos con 0, 4, 6 y 8 Gy de rayos gamma

Colec.	Sitio I							Sitio II							
	Gy	DM		n	DS		t	DM		n	DS		t		
		PE	± EE		PE	± EE		PE	± EE		PE	± EE			
87-07	0							0.292	0.062	8	0.312	0.053	7	0.391	
	4							0.093	0.017	8	0.084	0.025	7	0.392	
	6							0.074	0.020	8	0.098	0.026	7	0.256	
	8							0.047	0.015	8	0.055	0.021	7	0.390	
88-07	0							0.384	0.013	10	0.368	0.037	9	0.372	
	4							0.098	0.008	10	0.092	0.022	9	0.404	
	6							0.039	0.007	10	0.060	0.012	9	0.078	
	8							0.037	0.000	10	0.029	0.007	9	0.199	
89-01	0							0.525	0.021	8	0.450	0.045	9	0.080	
	4							0.144	0.024	8	0.111	0.018	9	0.141	
	6							0.086	0.021	8	0.056	0.009	9	0.108	
	8							0.055	0.015	8	0.037	0.008	9	0.162	
89-07	0							0.385	0.045	9	0.415	0.027	10	0.288	
	4							0.300	0.019	9	0.399	0.029	10	* 0.006	
	6							0.186	0.022	9	0.251	0.025	10	* 0.034	
	8							0.057	0.009	9	0.082	0.021	10	0.153	
90-01	0							0.398	0.038	10	0.285	0.020	12	* 0.010	
	4							0.283	0.029	10	0.222	0.021	12	* 0.053	
	6							0.155	0.016	10	0.108	0.022	12	* 0.051	
	8							0.071	0.010	10	0.056	0.009	12	0.135	
90-07	0							0.264	0.017	10	0.343	0.019	10	* 0.003	
	4							0.219	0.019	10	0.294	0.018	10	* 0.005	
	6							0.160	0.019	10	0.216	0.014	10	* 0.015	
	8							0.077	0.014	10	0.082	0.007	10	0.373	
91-01	0	0.498	0.018	12	0.377	0.021	12	* 0.000	0.538	0.036	10	0.383	0.030	12	* 0.008
	4	0.404	0.024	12	0.301	0.019	12	* 0.002	0.460	0.029	10	0.370	0.024	12	0.066
	6	0.217	0.023	12	0.153	0.021	12	* 0.028	0.306	0.038	10	0.186	0.023	12	* 0.016
	8	0.115	0.018	12	0.042	0.006	12	* 0.001	0.237	0.027	10	0.107	0.015	12	* 0.001
91-07	0	0.417	0.032	10	0.446	0.024	11	0.238	0.389	0.030	10	0.448	0.030	12	0.090
	4	0.307	0.028	10	0.416	0.014	11	* 0.002	0.368	0.021	10	0.384	0.024	12	0.311
	6	0.203	0.026	10	0.301	0.016	11	* 0.003	0.214	0.022	10	0.226	0.024	12	0.352
	8	0.072	0.017	10	0.092	0.019	11	0.219	0.067	0.006	10	0.042	0.008	12	* 0.011
92-01	0	0.515	0.027	10	0.307	0.031	12	* 0.000	0.378	0.017	9	0.340	0.030	9	0.148
	4	0.349	0.032	10	0.165	0.019	12	* 0.000	0.280	0.024	9	0.256	0.028	9	0.261
	6	0.177	0.017	10	0.052	0.007	12	* 0.000	0.216	0.018	9	0.069	0.017	9	* 0.000
	8	0.111	0.008	10	0.028	0.003	12	* 0.000	0.235	0.021	9	0.020	0.005	9	* 0.000
92-07	0	0.427	0.035	10	0.348	0.024	9	0.177	0.400	0.047	9	0.409	0.032	10	0.440
	4	0.245	0.023	10	0.262	0.025	9	0.094	0.264	0.053	9	0.301	0.025	10	0.268
	6	0.180	0.015	10	0.140	0.018	9	0.164	0.188	0.043	9	0.136	0.024	10	0.154
	8	0.104	0.015	10	0.051	0.009	9	* 0.008	0.108	0.021	9	0.029	0.006	10	* 0.003

93-01	0	0.317	0.031	8	0.417	0.034	10	*	0.023	0.378	0.023	10	0.359	0.032	10	0.316
	4	0.270	0.029	8	0.318	0.033	10		0.146	0.246	0.022	10	0.218	0.021	10	0.189
	6	0.235	0.033	8	0.168	0.021	10	*	0.057	0.173	0.014	10	0.139	0.015	10	* 0.056
	8	0.164	0.019	8	0.118	0.018	10	*	0.050	0.129	0.011	10	0.059	0.009	10	* 0.000
93-07	0	0.394	0.033	10	0.372	0.021	9		0.289	0.384	0.038	10	0.409	0.028	9	0.303
	4	0.350	0.042	10	0.318	0.021	9		0.255	0.235	0.021	10	0.351	0.031	9	* 0.004
	6	0.317	0.046	10	0.311	0.021	9		0.457	0.198	0.020	10	0.257	0.020	9	* 0.027
	8	0.166	0.029	10	0.144	0.031	9		0.306	0.126	0.018	10	0.117	0.017	9	0.359
94-01	0	0.469	0.035	10	0.463	0.030	10	*	0.003	0.422	0.028	11	0.436	0.029	9	* 0.046
	4	0.356	0.027	10	0.396	0.015	10		0.001	0.284	0.029	11	0.385	0.034	9	* 0.002
	6	0.256	0.020	10	0.242	0.025	10	*	0.000	0.226	0.021	11	0.303	0.027	9	* 0.002
	8	0.197	0.016	10	0.099	0.014	10	*	0.000	0.142	0.011	11	0.262	0.034	9	* 0.001
94-07	0	0.494	0.051	9	0.481	0.046	8	*	0.013	0.411	0.036	8	0.343	0.033	9	0.094
	4	0.298	0.032	9	0.367	0.030	8	*	0.003	0.274	0.041	8	0.180	0.023	9	* 0.036
	6	0.232	0.027	9	0.225	0.038	8	*	0.003	0.227	0.028	8	0.164	0.025	9	* 0.057
	8	0.137	0.014	9	0.123	0.023	8	*	0.001	0.142	0.020	8	0.113	0.009	9	0.111
95-01	0	0.391	0.024	9	0.405	0.039	10		0.384	0.397	0.021	10	0.354	0.025	12	0.098
	4	0.261	0.048	9	0.299	0.031	10		0.256	0.298	0.036	10	0.267	0.026	12	0.248
	6	0.192	0.027	9	0.181	0.014	10		0.358	0.207	0.017	10	0.160	0.017	12	* 0.033
	8	0.172	0.020	9	0.101	0.007	10	*	0.004	0.160	0.013	10	0.123	0.019	12	0.067
95-07	0	0.309	0.016	9	0.316	0.024	8		0.402	0.366	0.037	10	0.313	0.018	10	0.123
	4	0.220	0.013	9	0.232	0.028	8		0.358	0.257	0.026	10	0.236	0.014	10	0.246
	6	0.168	0.014	9	0.166	0.023	8		0.466	0.188	0.020	10	0.147	0.014	10	0.065
	8	0.131	0.014	9	0.134	0.022	8		0.465	0.149	0.011	10	0.093	0.014	10	* 0.003
96-01	0	0.447	0.024	17	0.320	0.018	20	*	0.000	0.447	0.028	19	0.405	0.019	18	* 0.008
	4	0.299	0.020	17	0.252	0.020	20	*	0.052	0.299	0.019	19	0.312	0.013	18	* 0.029
	6	0.206	0.021	17	0.146	0.011	20	*	0.008	0.197	0.011	19	0.190	0.013	18	* 0.002
	8	0.107	0.011	17	0.069	0.004	20	*	0.002	0.103	0.011	19	0.091	0.007	18	* 0.000
96-07	0	0.339	0.016	17	0.316	0.024	16		0.222	0.323	0.010	18	0.310	0.020	20	0.292
	4	0.220	0.013	17	0.234	0.014	16		0.244	0.204	0.018	18	0.228	0.012	20	0.142
	6	0.154	0.010	17	0.173	0.011	16		0.126	0.151	0.014	18	0.164	0.008	20	0.236
	8	0.059	0.009	17	0.092	0.009	16	*	0.016	0.092	0.009	18	0.049	0.006	20	* 0.000
97-01	0	0.450	0.019	19	0.399	0.023	17	*	0.049	0.396	0.020	11	0.364	0.015	19	0.110
	4	0.350	0.014	19	0.337	0.023	17		0.312	0.295	0.020	11	0.321	0.015	19	0.146
	6	0.243	0.011	19	0.197	0.018	17	*	0.020	0.198	0.013	11	0.211	0.013	19	0.237
	8	0.136	0.008	19	0.077	0.008	17	*	0.000	0.081	0.010	11	0.079	0.010	19	0.443
97-07	0	0.355	0.030	10	0.345	0.011	10		0.372	0.342	0.020	9	0.331	0.022	9	0.361
	4	0.251	0.012	10	0.255	0.012	10		0.407	0.234	0.015	9	0.243	0.025	9	0.384
	6	0.177	0.014	10	0.186	0.017	10		0.340	0.175	0.009	9	0.210	0.016	9	* 0.033
	8	0.108	0.011	10	0.126	0.012	10		0.143	0.123	0.013	9	0.118	0.013	9	0.400

DM. *D. melanogaster*. DS. *D. simulans*; PE: Proporción de Eclosión; EE error estándar. *, significativo a $p < 0.05$ y t prueba de t

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 2. Resultados de la estimación de parámetros de los grupos de datos de los testigos.

Especie	Sitio	N	Ciclo (años)
<i>D. melanogaster</i>	I	0.2148	3.02
<i>D. simulans</i>	I	0.1666	3.12
<i>D. melanogaster</i>	II	0.2214	3.15
<i>D. simulans</i>	II	0.1986	2.98

N, Norma de los residuales

Tabla 3. Resultados de la prueba de MANOVA de la comparación entre *D. melanogaster* y *D. simulans*.

Prueba	Valor	n
Wilk's Laambda	0.91676*	29
Pillai's Trace	0.09434*	29
Hotelling-Lawley	0.08211*	29
Roy's Max Root	0.09721*	29

* $p < 0.0001$, grados de l. = 1

Tabla 4. Datos climatológicos de Laguna Verde

año		87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
	Mes	precipitación										
lluvias	j	154.6	151	157.4	144.2	340.1	226.6	623.2	63.8	21	113	48
	j	135.9	174.8	161.1	154.6	283.1	416.1	347.8	185.9	343	156	310
	a	154.8	146.1	170.1	128.9	230.3	412.8	265.4	299.1	235	210	99
	s	176.1	165.2	170.9	135.8	300.9	434.8	300.1	121.8	296	62	308
	o	165.6	164.5	173.5	144.9	73.6	131	27.7	148.5	123	40	136
	X	157.4	160.32	166.6	141.68	245.6	324.26	312.84	163.82	203.66	116.152	180.28
secas	n	158	148.4	133.9	46.5	71.5	7.1	15.1	96.1	130	134	27
	d	130	141.4	97	127.1	91.7	28.7	0	19.1	23	33	4
	e	137	115.3	138	119.5	12.5	8.1	0	58	10	2	7
	f	135.9	138.1	132.2	136.3	6.5	31.6	48	7.3	8	9	3
	m	155.2	136.4	170.9	161.2	16.4	34	7.3	0	23	33	80
	a	149.9	158.7	173.9	158.2	20.1	56.8	75.8	48.2	3	23	67
	m	149.3	170.6	189	180.2	14.6	83.5	107.6	89.2	122	36	113
	X	145.042	144.128	147.842	132.714	33.3285	35.6857	36.2571	45.4142	45.4571	38.6285	
42.8428	temperatura X °C a 1.5 m de altura											
lluvias	j	28.4	27.2	26.4	24.425	23.8833	23.925	23.525	23.9166	24.425	21.6	23.575
	j	27.6	27.1	26.4	25.9	25.7	26.6	25.9	26.25	25.75	26	27.35
	a	27.8	27.1	27.1	26.5	25.5	25.65	26	25	26.5	25.25	28
	s	27.5	26.3	27.1	26.5	26.2	26.5	26.25	25.6	26	26.5	27.35
	o	24.7	23.6	24.5	26.65	24.55	24.9	23.5	26	26.65	24.85	26.25
	X	27.2	26.26	26.3	25.995	25.1666	25.515	25.035	25.3533	25.865	24.84	26.505
secas	n	22.6	25.6	23.7	23.5	20.55	21.45	21.5	24.45	21.5	23.5	24.95
	d	21.2	21.1	19.9	21.35	21.1	22.75	19.5	23	21.35	18.25	19.9
	e	18.8	19.7	21.1	19.75	20.5	20.4	21.25	20.75	21.25	18.25	19.75
	f	21.4	20	20.5	21.55	20.7	22.45	20.4	21.65	21.55	18.6	19.5
	m	21.8	23	20.6	23.5	23.2	24	20.75	23.5	22.25	19.5	22
	a	22.2	25.7	25.7	25.5	25.6	24	25.5	23.9	25.5	22	23
	m	26.6	28.3	27.5	26.25	25.8	25.1	26.25	26.5	29.25	25.5	29.5
	X	22.0857	23.3428	22.7142	23.0571	22.4928	22.8785	22.1642	23.3928	23.2357	20.8	22.6571

X: promedio

Tabla 5. Comparación de la proporción de eclosión de *D. melanogaster* y *D. simulans* entre las colectas de la temporada de lluvias y secas

		LLUVIAS				SECAS			
		Sitio I		Sitio II		Sitio I		Sitio II	
colecta	Gy	DM	DS	DM	DS	DM	DS	DM	DS
91	0	0.417	0.446	0.389	0.448	0.498	0.377	0.538	0.383
92	0	0.427	0.348	0.400	0.409	0.515	0.307	0.378	0.340
93	0	0.394	0.372	0.384	0.409	0.317	0.417	0.378	0.359
94	0	0.494	0.481	0.411	0.343	0.469	0.463	0.422	0.436
95	0	0.309	0.316	0.366	0.313	0.391	0.405	0.397	0.354
96	0	0.339	0.316	0.323	0.310	0.447	0.320	0.447	0.405
97	0	0.355	0.345	0.342	0.331	0.450	0.399	0.396	0.364
X		0.390	0.370	0.373	0.371	0.440	0.380	0.420	0.380
t		0.080	0.380	*0.03	0.320				
91	4	0.307	0.416	0.368	0.384	0.404	0.301	0.460	0.370
92	4	0.245	0.262	0.264	0.301	0.349	0.165	0.280	0.256
93	4	0.350	0.318	0.235	0.351	0.270	0.318	0.246	0.218
94	4	0.298	0.367	0.274	0.180	0.356	0.396	0.284	0.385
95	4	0.220	0.232	0.257	0.236	0.261	0.299	0.298	0.267
96	4	0.220	0.234	0.204	0.228	0.299	0.252	0.299	0.312
97	4	0.251	0.255	0.234	0.243	0.350	0.337	0.295	0.321
X		0.270	0.301	0.260	0.270	0.330	0.303	0.310	0.300
t		*0.028	0.477	0.092	0.214				
91	6	0.203	0.301	0.214	0.226	0.217	0.153	0.306	0.186
92	6	0.180	0.140	0.188	0.136	0.177	0.052	0.216	0.069
93	6	0.317	0.311	0.198	0.257	0.235	0.168	0.173	0.139
94	6	0.232	0.225	0.227	0.164	0.256	0.242	0.226	0.303
95	6	0.168	0.166	0.188	0.147	0.192	0.181	0.207	0.160
96	6	0.154	0.173	0.151	0.164	0.206	0.146	0.197	0.190
97	6	0.177	0.186	0.175	0.210	0.243	0.197	0.198	0.211
X		0.203	0.210	0.190	0.190	0.220	0.160	0.220	0.180
t		0.291	0.075	0.096	0.418				
91	8	0.072	0.092	0.067	0.042	0.115	0.042	0.237	0.107
92	8	0.104	0.051	0.108	0.029	0.111	0.028	0.235	0.020
93	8	0.166	0.144	0.126	0.117	0.164	0.118	0.129	0.059
94	8	0.137	0.123	0.142	0.113	0.197	0.099	0.142	0.262
95	8	0.131	0.134	0.149	0.093	0.172	0.101	0.160	0.123
96	8	0.059	0.092	0.092	0.049	0.107	0.069	0.103	0.091
97	8	0.108	0.126	0.123	0.118	0.136	0.077	0.081	0.079
X		0.110	0.110	0.120	0.080	0.140	0.080	0.160	0.110
t		0.062	*0.042	0.075	0.223				

DM: *D. melanogaster*, DS: *D. simulans*, X: promedio y t: prueba de t

Tabla 6. Proporción de eclosión de *D. melanogaster* y *D. simulans* de las colectas de las temporadas de lluvias y secas

Lluvias				Secas					
DM		DS		DM		DS			
X	± EE	n	X	± EE	n	X	± EE	n	
			0.292	0.062	08	0.312	0.053	08	
			0.384	0.013	10	0.368	0.037	09	
0.385	0.045	09	0.415	0.027	10	0.525	0.021	08	
0.264	0.017	10	0.343	0.019	10	0.398	0.038	10	
0.403	0.031	10	0.447	0.027	12	0.518	0.027	11	
0.414	0.041	10	0.378	0.028	10	0.446	0.022	10	
0.389	0.036	10	0.390	0.025	09	0.348	0.027	09	
0.453	0.043	09	0.412	0.040	09	0.445	0.032	11	
0.337	0.027	10	0.315	0.021	09	0.394	0.022	11	
0.331	0.013	18	0.313	0.022	18	0.447	0.026	18	
0.349	0.025	10	0.338	0.016	10	0.423	0.020	15	
0.369			0.372			0.438			
							0.450	0.045	09
							0.285	0.020	12
							0.380	0.026	12
							0.324	0.031	11
							0.388	0.033	10
							0.450	0.029	10
							0.379	0.032	11
							0.362	0.018	19
							0.382	0.019	18
							0.378		

DM: *D. melanogaster*, DS: *D. simulans* y t: prueba de t

Tabla 7. Resultados de la prueba de t de la comparación entre las especies del Sitio I y el II

Gy	Sitio I				Sitio II					
	DM		DS		DM		DS			
	X	± EE	X	± EE	n (col)	X	± EE	X	± EE	n (col)
0	0.416	0.018	0.379	0.015	14	0.398	0.014	0.372	0.012	20
t	0.068				0.078					
4	0.299	0.015	0.296	0.018	14	0.286	0.017	0.290	0.018	20
t	0.467				0.436					
6	0.211	0.012	0.189	0.018	14	0.205	0.010	0.183	0.015	20
t	0.148				0.405					
8	0.127	0.010	0.093	0.010	14	0.135	0.013	0.093	0.016	20
t	0.01				0.027					

DM: *D. melanogaster*, DS: *D. simulans*, t: prueba de t y ***: Significativo a $P < 0.001$ al compararlo con el testigo.

Tabla 8. Resultados de la prueba de MANOVA de la comparación entre los tratamientos con 0, 4, 6 y 8 Gy de rayos gamma

Prueba	Valor	n
Wilk's Lambda	0.08864*	281
Pillai's Trace	0.91136*	281
Hotelling-Lawley	10.2817*	281
Roy's Max Root	10.2817*	281

*: significativo a $p < 0.0001$, grados de libertad 3

Tabla 9. Comparación de la proporción de eclosión promedio de *D. melanogaster* y *D. simulans* de los Sitios I y II después de los tratamientos con 0, 4, 6 y 8 Gy de rayos gamma

Colecta	Gy	Sitio I				Sitio II				<i>t</i> m IvII	<i>t</i> s IvII				
		DM		DS		DM		DS							
		\bar{X}	$\pm EE$	n	\bar{X}	$\pm EE$	n	\bar{X}	$\pm EE$	n					
91-01	0	0.498	0.018	12	0.377	0.021	12	0.538	0.036	10	0.383	0.030	12	0.169	0.158
91-07	0	0.417	0.032	10	0.446	0.024	11	0.389	0.030	10	0.448	0.030	12	0.266	0.483
92-01	0	0.515	0.027	10	0.307	0.031	12	0.378	0.017	9	0.340	0.030	9	* 0.000	0.231
92-07	0	0.427	0.035	10	0.348	0.024	9	0.400	0.047	9	0.409	0.032	10	0.324	0.295
93-01	0	0.317	0.031	8	0.417	0.034	10	0.378	0.023	10	0.359	0.032	10	0.068	0.116
93-07	0	0.394	0.033	10	0.372	0.021	9	0.384	0.038	10	0.409	0.028	9	0.420	0.155
94-01	0	0.469	0.035	10	0.463	0.030	10	0.422	0.028	11	0.436	0.029	9	0.155	0.238
94-07	0	0.494	0.051	9	0.481	0.046	8	0.411	0.036	8	0.343	0.033	9	0.101	* 0.015
95-01	0	0.391	0.024	9	0.405	0.039	10	0.397	0.021	10	0.354	0.025	12	0.427	0.142
95-07	0	0.309	0.016	9	0.316	0.024	8	0.366	0.037	10	0.313	0.018	10	0.100	0.465
96-01	0	0.447	0.024	17	0.320	0.018	20	0.447	0.028	19	0.405	0.019	18	0.496	* 0.012
96-07	0	0.339	0.016	17	0.316	0.024	16	0.323	0.010	18	0.310	0.020	20	0.214	0.428
97-01	0	0.450	0.019	19	0.399	0.023	17	0.396	0.020	11	0.364	0.015	19	* 0.030	0.108
97-07	0	0.355	0.030	10	0.345	0.011	10	0.342	0.020	9	0.331	0.022	9	0.355	0.294
<i>t</i>		0.217			0.347										
91-01	4	0.404	0.024	12	0.301	0.019	12	0.460	0.029	10	0.370	0.024	12	0.076	* 0.002
91-07	4	0.307	0.028	10	0.416	0.014	11	0.368	0.021	10	0.384	0.024	12	* 0.047	0.138
92-01	4	0.349	0.032	10	0.165	0.019	12	0.280	0.024	9	0.256	0.028	9	* 0.051	* 0.008
92-07	4	0.245	0.023	10	0.262	0.025	9	0.264	0.053	9	0.301	0.025	10	0.374	0.391
93-01	4	0.270	0.029	8	0.318	0.033	10	0.246	0.022	10	0.218	0.021	10	0.260	* 0.012
93-07	4	0.350	0.042	10	0.318	0.021	9	0.235	0.021	10	0.351	0.031	9	* 0.015	0.195
94-01	4	0.356	0.027	10	0.396	0.015	10	0.284	0.029	11	0.385	0.034	9	* 0.041	0.172
94-07	4	0.298	0.032	9	0.367	0.030	8	0.274	0.041	8	0.180	0.023	9	0.324	* 0.000
95-01	4	0.261	0.048	9	0.299	0.031	10	0.298	0.036	10	0.267	0.026	12	0.271	0.221
95-07	4	0.220	0.013	9	0.232	0.028	8	0.257	0.026	10	0.236	0.014	10	0.120	0.448
96-01	4	0.299	0.020	17	0.252	0.020	20	0.299	0.019	19	0.312	0.013	18	0.494	* 0.041
96-07	4	0.220	0.013	17	0.234	0.014	16	0.204	0.018	18	0.228	0.012	20	0.250	0.384
97-01	4	0.350	0.014	19	0.337	0.023	17	0.295	0.020	11	0.321	0.015	19	* 0.017	0.288
97-07	4	0.251	0.012	10	0.255	0.012	10	0.234	0.015	9	0.243	0.025	9	0.194	0.331
<i>t</i>		0.301			0.406										

91-01	6	0.217	0.023	12	0.153	0.021	12	0.306	0.038	10	0.186	0.023	12	*	0.032	0.071
91-07	6	0.203	0.026	10	0.301	0.016	11	0.214	0.022	10	0.226	0.024	12	*	0.382	0.009
92-01	6	0.177	0.017	10	0.052	0.007	12	0.216	0.018	9	0.069	0.017	9		0.071	0.190
92-07	6	0.180	0.015	10	0.140	0.018	9	0.188	0.043	9	0.136	0.024	10		0.432	0.257
93-01	6	0.235	0.033	8	0.168	0.021	10	0.173	0.014	10	0.139	0.015	10		0.060	0.133
93-07	6	0.317	0.046	10	0.311	0.021	9	0.198	0.020	10	0.257	0.020	9	*	0.018	* 0.044
94-01	6	0.256	0.020	10	0.242	0.025	10	0.226	0.021	11	0.303	0.027	9	*	0.159	* 0.008
94-07	6	0.232	0.027	9	0.225	0.038	8	0.227	0.028	8	0.164	0.025	9		0.451	0.101
95-01	6	0.192	0.027	9	0.181	0.014	10	0.207	0.017	10	0.160	0.017	12		0.318	0.178
95-07	6	0.168	0.014	9	0.166	0.023	8	0.188	0.020	10	0.147	0.014	10		0.224	0.255
96-01	6	0.206	0.021	17	0.146	0.011	20	0.197	0.011	19	0.190	0.013	18	*	0.351	* 0.031
96-07	6	0.154	0.010	17	0.173	0.011	16	0.151	0.014	18	0.164	0.008	20		0.434	0.268
97-01	6	0.243	0.011	19	0.197	0.018	17	0.198	0.013	11	0.211	0.013	19	*	0.007	0.265
97-07	6	0.177	0.014	10	0.186	0.017	10	0.175	0.009	9	0.210	0.016	9		0.450	0.155
t		0.333			0.405											

91-01	8	0.115	0.018	12	0.042	0.006	12	0.237	0.027	10	0.107	0.015	12	*	0.001	* 0.000	
91-07	8	0.072	0.017	10	0.092	0.019	11	0.067	0.006	10	0.042	0.008	12	*	0.383	* 0.014	
92-01	8	0.111	0.008	10	0.028	0.003	12	0.235	0.021	9	0.020	0.005	9	*	0.000	0.101	
92-07	8	0.104	0.015	10	0.051	0.009	9	0.108	0.021	9	0.029	0.006	10		0.443	* 0.017	
93-01	8	0.164	0.019	8	0.118	0.018	10	0.129	0.011	10	0.059	0.009	10		0.068	* 0.005	
93-07	8	0.166	0.029	10	0.144	0.031	9	0.126	0.018	10	0.117	0.017	9		0.128	0.226	
94-01	8	0.197	0.016	10	0.099	0.014	10	0.142	0.011	11	0.262	0.034	9	*	0.006	* 0.000	
94-07	8	0.137	0.014	9	0.123	0.023	8	0.142	0.020	8	0.113	0.009	9		0.415	0.349	
95-01	8	0.172	0.020	9	0.101	0.007	10	0.160	0.013	10	0.123	0.019	12		0.313	0.148	
95-07	8	0.131	0.014	9	0.134	0.022	8	0.149	0.011	10	0.093	0.014	10		0.176	0.073	
96-01	8	0.107	0.011	17	0.069	0.004	20	0.103	0.011	19	0.091	0.007	18		0.418	* 0.018	
96-07	8	0.059	0.009	17	0.092	0.009	16	0.092	0.009	18	0.049	0.006	20	*	0.009	* 0.001	
97-01	8	0.136	0.008	19	0.077	0.008	17	0.081	0.010	11	0.079	0.010	19	*	0.000	0.429	
97-07	8	0.108	0.011	10	0.126	0.012	10	0.123	0.013	9	0.118	0.013	9		0.191	0.336	
t		0.317			0.491												

Contiene los resultados comparados a partir de que hay datos en ambos sitios. m I v II: comparación de la PE de *D. melanogaster* del Sitio I vs el II y s I v II: de *D. simulans* del Sitio I vs el II.

Tabla 10. Resultados de la prueba de MANOVA de la comparación entre las especies considerando los tratamientos con 0, 4, 6 y 8 Gy de rayos gamma

Prueba	Valor	n
Wilk's Laambda	0.91566*	281
Pillai's Trace	0.08434*	281
Hotelling-Lawley	0.09211*	281
Roy's Max Root	0.09211*	281

*: significativo a $p < 0.0001$. grados de libertad 1

Tabla 11. Ajuste lineal para encontrar el incremento anual de la VHA del Sitio II

Especie	Dosis (Gy)	Función	r	N	M	(%)
<i>D.melanogaster</i>	4	$y = 0.0852 t - 7.394$	0.8636	0.1754	0.0852	0.666
<i>D.simulans</i>	4	$y = 0.0839 t - 7.2796$	0.8254	0.2026	0.0839	0.6479
<i>D.melanogaster</i>	6	$y = 0.0534 t - 4.6393$	0.8283	0.1276	0.0534	0.6796
<i>D.simulans</i>	6	$y = 0.0394 t - 3.3861$	0.6709	0.1539	0.0394	0.3731
<i>D.melanogaster</i>	8	$y = 0.0163t - 1.3982$	0.9499	0.0458	0.0163	0.2512
<i>D.simulans</i>	8	$y = 0.0142t - 1.2138$	0.5343	0.1923	0.0142	0.266

r: coeficiente de correlación, N: norma de los residuales, M: incremento anual de la VHA y %: promedio de crecimiento anual.

Tabla 12. Parámetros estadísticos de las curvas de las especies del Sitio II

Espece	Dosis (Gy)	r	S^2	DE
Sitio I				
<i>D. melanogaster</i>	8	0.3753	0.0012	0.0345
<i>D. simulans</i>	8	0.5828	0.0007	0.0278
Sitio II				
<i>D. melanogaster</i>	4	0.7324	0.0031	0.0561
<i>D. simulans</i>	4	0.7156	0.0044	0.0662
<i>D. melanogaster</i>	6	0.8094	0.0012	0.0343
<i>D. simulans</i>	6	0.4833	0.0034	0.0581
<i>D. melanogaster</i>	8	0.8201	0.0004	0.0204
<i>D. simulans</i>	8	0.4134	0.0023	0.0475

r : coeficiente de correlación, S^2 : varianza y DE : desviación estandar.

Tabla 13. Frecuencias alélicas de la superóxido dismutasa de *D. melanogaster* y *D. simulans* de Laguna Verde, Veracruz

Colecta 9607						
GENOTIPOS						
		n	S/S	F/F	S/F	
Sitio I	<i>D. melanogaste.</i>	9	0	1	(8)	0.88
	<i>D. simulans</i>	15	1	4	(10)	0.94
Sitio II	<i>D. melanogaster</i>	10	0	5	(5)	0.50
	<i>D. simulans</i>	19	0	0	(19)	1.00
Colecta 9701						
Sitio I	<i>D. melanogaster</i>	20	0	0	(20)	1.00
	<i>D. simulans</i>	109	1	4	(104)	0.95
Sitio II	<i>D. melanogaster</i>	12	0	0	(12)	1.00
	<i>D. simulans</i>	129	0	0	(129)	1.00
Colecta 9801						
Sitio I	<i>D. melanogaster</i>	57	0	1	(56)	0.98
	<i>D. simulans</i>	19	0	0	(19)	1.00
Sitio II	<i>D. melanogaster</i>	95	0	0	(95)	1.00
	<i>D. simulans</i>	19	0	0	(19)	1.00
Colecta 9807						
Sitio I	<i>D. melanogaster</i>	19	0	0	(19)	1.00
	<i>D. simulans</i>	36	0	0	(36)	1.00
Sitio II	<i>D. melanogaster</i>	6	0	0	(6)	1.00
	<i>D. simulans</i>	81	0	0	(81)	1.00
RESUMEN						
Sitio I	<i>D. melanogaster</i>	105	0	2	103	
	<i>D. simulans</i>	179	2	8	169	
Sitio II	<i>D. melanogaster</i>	123	0	5	118	
	<i>D. simulans</i>	248	0	0	248	
FRECUCIAS ALÉLICAS						
Sitio I	<i>D. melanogaster</i>	105	0.490	0.509		heterocigocidad 0.98
	<i>D. simulans</i>	179	0.483	0.516		0.94
Sitio II	<i>D. melanogaster</i>	123	0.479	0.520		0.96
	<i>D. simulans</i>	248	0.50	0.50		1.00