

69
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL METABOLISMO EN LA RESPUESTA
GENOTOXICA DE AZIDA DE SODIO EN CELULAS
DEL ALA DE *Drosophila melanogaster*

T E S I S

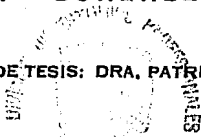
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

EDNA GONZALEZ CESAR

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCUELAS

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realiz ó la pasante _____
González César Edna
con número de cuenta 8426308-7 con el título: _____
"Efecto del metabolismo en la respuesta genotóxica
de azida de sodio en células del ala de Drosophila
melanogaster"

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
 Biólogo .

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

Dra Patricia Ramos Morales

Director de tesis

Dra Rosario Rodríguez Arnaiz

Dr. Arnulfo Albores Medina

Dra Marfa Cristina Pérez-Amador Barrón

Suplente

Dr René de Jesús Cárdenas Vázquez

Suplente

FIRMA

Ciudad Universitaria, D.F., a 21 de noviembre de 1994.

DEDICATORIAS

Muy especialmente a la persona que me he
alentado y apoyado durante toda mi vida,
con mucho cariño y agradecimiento: a mi Madre.

A mis hermanos:
Marisol, símbolo de fortaleza y alegría, por
ser además de hermana mi mejor amiga; a Oswaldo,
por su labor de unión en la familia.

A mi Padre:
Por darme la vida , por su cariño y comprensión.

A todas aquellas personas que a pesar de desearlo
no tuvieron las facilidades que yo tuve de
continuar sus estudios.

AGRADECIMIENTOS

Con mi más profundo agradecimiento y admiración, a la Dra. Patricia Ramos Morales a quien debo la mayor parte de mi formación profesional.

A los sinodales:

Dra Rosario Rodríguez Arnaiz

Dr. Arnulfo Albores Medina

Dra. Ma. Cristina Pérez-Amador

Dr. René Cárdenas Vázquez

Por sus atenciones y valiosos comentarios.

A todos mis amigos, por su compañía y ayuda en los momentos difíciles.

A Héctor y Julián por su paciente e insustituible ayuda en la captura de esta tesis; así como a la gran asesoría de Lupita a lo largo de este trabajo.

A los compañeros del laboratorio: Ma. de Jesús, Paty Orozco, Juan Carlos, Armando, Judith, Irma, Adriana, y Yolanda, ya que de una u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética "Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

RESUMEN	ii
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODO	25
RESULTADOS.....	27
DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFIA	43

RESUMEN

La azida de sodio es un compuesto con múltiples usos en la industria, en la agricultura, en la medicina y en la investigación; su actividad mutagénica y mecanismos de acción aún no han sido definidos.

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en células de las alas de *Drosophila melanogaster* se utiliza para evaluar el potencial genotóxico de sustancias que representan un posible riesgo para los seres vivos. Una de las innovaciones dentro de esta prueba ha sido la creación de cepas metabólicas con una incrementada capacidad para biotransformar compuestos xenobióticos.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la azida de sodio en la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en las alas de *D. melanogaster* tanto en la craza estándar como en la que emplea cepas con metabolismo diferencial.

En ambas cruzas, el agente se administró por alimentación a larvas de 72 ± 4 horas de edad en un tratamiento semicrónico de 48 horas. Las concentraciones empleadas fueron 0.50, 0.63, 0.75, 0.88 y 1.0 mM; se corrió además un testigo negativo con agua destilada.

Se registró el número, tamaño y tipo de células afectadas y el análisis estadístico se realizó a través del programa de cómputo SMART a un nivel de significancia del 0.05.

En la craza estándar la respuesta fue positiva en todas las concentraciones para manchas chicas, grandes, gemelas y totales, excepto en 0.50 y 0.63 mM para manchas simples chicas y gemelas donde el resultado fue estadísticamente indeterminado. En la craza metabólica sólo se obtuvo respuesta en 0.63 para manchas totales y en 0.63, 0.88 y 1.0 mM para manchas simples grandes.

Así, sólo se detectó actividad mutagénica y recombinogénica de la azida de sodio en la craza estándar mientras que la respuesta negativa encontrada en la craza metabólica podría deberse a su mayor capacidad de desintoxicación, la que transformaría o modificaría a la azida a un metabolito no genotóxico fácilmente excretable.

También podría deberse este resultado a la inhibición de las enzimas oxireductasas por la unión de la azida a las proteínas microsomales. Por lo que se puede concluir que la azida de sodio actúa de forma directa en *D. melanogaster*.

INTRODUCCION

Todos los organismos incluyendo a los seres humanos están expuestos cada vez más a una enorme variedad de sustancias (Cassaret, 1975). De acuerdo con Timbrell (1989), alrededor de 65 000 compuestos químicos se producen en los Estados Unidos, y cada año se suman a la lista entre 500 y 1000 sustancias nuevas.

Los tóxicos ambientales, son compuestos que al ser liberados al medio ambiente alteran el balance ecológico y constituyen un riesgo para la salud de los seres humanos al provocar efectos adversos para la salud (OMS, 1980; Lippmann, 1992). Se dispersan en la atmósfera a temperaturas y presiones normales en forma gaseosa, líquida y sólida (Fig. 1).

La exposición implica el contacto entre un compuesto xenobiótico que puede estar en el aire, el agua, o el alimento, y la población de interés.

Los orígenes de las sustancias tóxicas son variados, éstas pueden clasificarse de diversas maneras, una de las más simples es la que distingue entre compuestos naturales y sintéticos, aunque existen algunos que son emitidos por fuentes naturales y además son sintetizados por el hombre en cantidades que superan a las naturales (Timbrell, 1989).

Las diferentes rutas por las que ingresan las sustancias extrañas a los organismos (respiratoria, oral, contacto dérmico) imponen distintas barreras al paso de éstas (Fig. 2). Por lo anterior, la distribución de los contaminantes en el interior del cuerpo es altamente dependiente de su capacidad para atravesar las membranas biológicas. Los principales mecanismos implicados son: transporte pasivo y transporte especializado (Fig. 3).

Una vez en el sistema circulatorio, el compuesto es transportado a través del cuerpo, en este proceso puede: 1) unirse a una macromolécula; 2) sufrir transformación metabólica (biotransformación); 3) depositarse para su almacenamiento en algún lugar, que puede o no ser el sitio de su acción tóxica; o 4) ser excretado. Los efectos tóxicos pueden presentarse en cualquier

sitio.

Debido al incremento en el número y diversidad de los compuestos químicos es importante conocer los efectos tóxicos que pueden provocar en los seres vivos e intentar evaluarlos. De esta manera, el término riesgo ambiental implica la probabilidad de daño como resultado de la exposición a un contaminante ambiental o a la combinación de varios compuestos. La evaluación de riesgo ambiental involucra una secuencia de pasos interrelacionados, que empiezan con la identificación del agente causante, o la localización de la fuente de emisión, y culmina con la evaluación del número de organismos a los que puede afectar y la severidad del impacto al ambiente (Lippmann, 1992).

La toxicología se ocupa de la evaluación y cuantificación del riesgo de la exposición a las sustancias químicas; así como de la predicción de sus efectos en los individuos de una especie con base en pruebas realizadas con otra especie (OMS, 1980). Un elemento central de la toxicología es establecer el uso seguro de los compuestos químicos, mediante la identificación del "daño", definido como la probabilidad de que un compuesto químico pueda producir una lesión bajo condiciones específicas, y el establecer los límites de "seguridad", definidos como la certeza de que un compuesto químico no provocará daño bajo condiciones específicas en cuanto a la cantidad y manera de uso (OMS, 1980; Cassaret, 1975).

Por otra parte, la principal función de la genética toxicológica es la implementación de métodos y pruebas para identificar y evaluar el impacto de los compuestos que se encuentran en el ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad de los componentes hereditarios; además, trata de conocer la secuencia de eventos iniciales a partir de la interacción primaria del agente con el ADN, hasta el paso final que es la expresión del daño genético. Dada la vinculación entre la actividad mutagénica de diversas sustancias químicas con su capacidad carcinogénica, la genética toxicológica desempeña un doble papel, por un lado se ocupa del daño que ocasionan los agentes químicos y físicos en las células germinales, y por el

otro, estudia las asociaciones predictivas entre genotoxicidad y el inicio de neoplasias (Casarett, 1975; Vogel, 1991; Lippmann, 1992).

El concepto de que el cáncer se asocia con cambios en el material genético fue propuesto por Boveri en 1914; y en 1928 K.H. Bauer formuló la teoría de la mutación somática. Hoy día se sabe que la mayoría de los carcinógenos modifican el ADN, en muchos casos como resultado de una unión covalente entre el carcinógeno y las bases púricas o pirimídicas (Fig. 4).

No todos los mutágenos químicos son carcinógenos, sin embargo muchos carcinógenos en los seres humanos, son mutágenos en sistemas celulares microbianos, de mamíferos o de otros animales con activación metabólica *in vivo* e *in vitro*. La relación empírica, cada vez mas firme entre la mutagénesis y la carcinogénesis, no implica que ambos procesos sean idénticos, si bien ofrece un método prometedor para utilizar la mutagénesis como ensayo preselector rápido de carcinogénesis (Vogel, 1991).

Existen procedimientos aplicables a las pruebas de toxicidad. Las principales diferencias en las pruebas de mutagenicidad son: la dosis empleada, la duración de la exposición, así como la capacidad de biotransformación que tenga el organismo en cuestión (OMS, 1980).

La exposición puede ser aguda, si el organismo recibe la dosis total de un compuesto en una sola ocasión, generalmente la dosis recibida es alta y la duración de la exposición es breve. En contraste, es sumamente importante evaluar los efectos de la exposición crónica en la cual la dosis total se reparte en varias exposiciones, durante un periodo de tiempo prolongado, por lo que aún dosis sumamente bajas pueden producir efectos detectables.

La tasa de absorción y la de distribución pueden alterar los efectos en los tratamientos crónicos y agudos. En la exposición crónica, si la tasa de absorción excede a la de eliminación, la sustancia tóxica se acumulará hasta alcanzar un nivel estable donde la tasa de eliminación será igual a la de administración.

Los estudios de toxicidad en animales permiten estimar el potencial tóxico de una sustancia química para los seres humanos.

(OMS, 1980).

La acción tóxica de las sustancias químicas afecta a todo el organismo, si bien el daño primario puede estar localizado en un órgano u órganos blanco específicos (Casarett, 1975). Entre las diversas respuestas tóxicas que muestra un organismo se encuentran la enfermedad y la letalidad, la segunda es una expresión precisa, cuantificable e inequívoca de la toxicidad de un compuesto químico. Por ejemplo, la dosis letal 50 (LD₅₀) es aquella en la que muere la mitad de la población expuesta a una sustancia. Cuando no es posible determinar la dosis, se obtiene la concentración letal₅₀ (LC₅₀) como el índice de toxicidad (OMS, 1980).

La acción de los mutágenos al interaccionar con el material genético implica un proceso de pasos múltiples; una vez que se produjo el daño, éste puede o no ser removido por mecanismos específicos de reparación del ADN. Si la reparación es incorrecta esto dará origen a diversos efectos biológicos (Fig. 5).

Los agentes genotóxicos se pueden dividir en los denominados directos (agentes genotóxicos terminales) debido a que reaccionan directamente con las macromoléculas (ADN, proteínas) y aquellos que requieren activación metabólica (agentes precursores o promutágenos) (Fig. 6). Estos últimos no poseen propiedades genotóxicas *per se* pero se convierten en especies genotóxicas terminales al ser biotransformadas en la célula (Vogel, 1991).

AZIDA DE SODIO

Las azidas son sustancias generalmente cristalinas, que por calentamiento se descomponen en forma explosiva. Se obtienen por acción del ácido nitroso con las hidrazidas (Beyer, 1987).

Muchos agentes oxidantes atacan a la hidrazina para formar pequeñas cantidades de HN₃, o azidas. El ácido hidrazoico (pKa 25= 4.75), se obtiene puro por destilación de soluciones acuosas; es un líquido incoloro (p.e. 37°C) y peligrosamente explosivo. Se conocen

azidas de muchos metales pesados que, por lo común, son explosivas; las azidas de plomo, mercurio y bario explotan cuando son golpeadas bruscamente, por lo que se usan en casquillos detonantes (Cotton y Wilkinson, 1988).

Las azidas de los metales electropositivos no son explosivas, y, de hecho, se descomponen de manera cuantitativa, cuando se les calienta a 300°C, por ejemplo:



El ión azida también funciona como ligante en complejos de metales de transición. En general, el N_3^- se comporta como un ión halogenuro, y por lo común se le considera un pseudohalogenuro, aunque no se conoce el pseudohalógeno correspondiente $(\text{N}_3)_2$ (Cotton y Wilkinson, 1988; Beyer, 1987).

Propiedades físicas y químicas

Las azidas se pueden clasificar en dos grupos principales: azidas inorgánicas, las cuales contienen un grupo simétrico azida y exhiben cierto grado de unión iónica; y las azidas orgánicas, en las cuales existe una unión covalente (Fig.7).

Desde el descubrimiento del ácido hidrazoico en 1890, las azidas inorgánicas han sido sujetas a una extensa investigación, así pueden agruparse en 5 clases:

- a) **Azidas simples**, incluyen a aquellas azidas metálicas sencillas tales como azida de sodio (NaN_3), azida de potasio (KN_3), y azida de bario $\text{Ba}(\text{N}_3)_2$. Todas las valencias en estos compuestos están unidas al grupo azida.
- b) **Azidas compuestas**, compuestas de un grupo azida así como de otros ligandos, como por ejemplo, la azida halidas y las azidas básicas (por ejemplo níquel hidróxido azida $(\text{OH})\text{Ni}(\text{N}_3)$).

- c) **Hetero azidas**, estos compuestos contienen el grupo azida unido covalentemente a una estructura de al menos dos elementos de los grupos V y VI de la tabla periódica. Un ejemplo es el cianógeno de azida.
- d) **Complejo azida**, estos complejos tienen el ión azida como la esfera ligando interior.
- e) **Azidas metalorgánicas**, estas representan una clase de compuestos que poseen la combinación de metal-carbón y metal-azida.

El ion azida como N_3^- en NaN_3 , es lineal y posee un centro de simetría, es decir, tiene igual distancia N-N. Sin embargo, las azidas covalentes o las azidas orgánicas son también lineares, pero asimétricas. Su estructura electrónica se puede representar de acuerdo con la teoría de enlaces covalentes, de tres diferentes formas (Cotton y Wilkinson, 1988; Beyer, 1987; Kleinhofs et al., 1978)(Fig. 8).

El grupo azida posee las características necesarias de un grupo excelente de inicio de síntesis de una amplia variedad de compuestos como las aminas, nitreno, iminas y triazoles. Recientemente el ión azida se ha usado para sintetizar derivados nucleósidos de azida, también se han empleado derivados de azida como compuestos de fotoafinidad para estudiar la unión de ligandos a las proteínas. La azida reacciona con electrófilos así como con nucleófilos (Fig. 9); se le encuentra como sal de sodio o de potasio.

La descomposición de azidas inorgánicas por calor produce gas nitrógeno y un residuo de metal o nitritos, óxidos, hidroazidas, y carbonatos.

La exposición de azidas inorgánicas a ácido sulfhídrico concentrado produce ácido hidrazoico (HN_3), el cual es volátil, tóxico y explosivo. Se considera que la toxicidad del ácido hidrazoico es similar a la de cianida de hidrógeno, su concentración en el aire es superior a los 0.005 mg/l, además provoca marcados síntomas de intoxicación.

La azida de sodio es una sal altamente soluble en agua caliente o fría, ligeramente soluble en alcohol, y relativamente estable, con un pK de 4.8 ($K_a = 2 \times 10^{-5}$). Así, todas las soluciones de azida de sodio contienen algo de ácido hidrazoico y las soluciones ácidas son ricas en ácido hidrazoico no cargado, el cual tiene un punto de ebullición de 37°C, por lo que escapa rápidamente en el aire a partir de soluciones acuosas (Kleinhofs et al., 1978; Beyer, 1987).

Este compuesto tiene múltiples usos. En la agricultura, es fungicida en la conservación de vinos, es estimulante de la germinación, nematocida, y desinfectante de granos. En medicina, se usa como conservador en productos de diagnóstico y en el tratamiento de hipertensión. La azida de sodio se utiliza en la investigación como un inhibidor respiratorio, y un bactericida selectivo ya que inhibe a la catalasa, a la peroxidasa, y desacopla a la citocromo oxidasa. En la industria, las azidas metálicas se usan como detonadores, en la producción de caucho, en la purificación de aleaciones de aluminio y de silicón con aluminio, para prevenir la oxidación de acero, y/o reducir la coagulación de látex de estireno-butadieno. Se utiliza también para inflar bolsas de aire en automóviles (Nilan et al., 1973; Tomlinson, 1980; Index Merck, 1989).

Efectos fisiológicos

La azida tiene numerosos efectos fisiológicos. Después de que Curtis (1890) preparó azoimida (HN_3), Loew (1891) estudió su efecto en una gran variedad de organismos: bacterias, algas, ciliados, gusanos, crustáceos, larvas de insectos, plantas superiores, y vertebrados; en la mayoría de los organismos se observó un fuerte efecto tóxico. Mientras que algunos murieron en 2-3 h en una solución 0.5% de azida, otros fueron más resistentes; algunos ciliados permanecieron por 12 días en una solución 0.1%. La dosis letal para ratón se reportó en 40 mg/kg, mientras que 30 mg/kg mataron a un perro en 104 min por falla respiratoria. La dosis

letal mínima por inyección en ratas fue de 35-38 mg/kg de peso. En ratas el ácido hidrazoico es letal en cantidades superiores a 1160 ppm durante una hora (Kleinhofs et al., 1978).

La mayor efectividad de la azida en pH ácidos es debida probablemente a la mejor penetración de las membranas celulares por esta molécula neutra (Nilan, 1973).

Algunos experimentos con animales mostraron que el ácido hidrazoico en altas dosis es extremadamente tóxico, causa irritación de las membranas mucosas y estimula la respiración; en pequeñas dosis, la azida de sodio y el ácido hidrazoico provocan una marcada caída en la presión sanguínea (Kleinhofs et al., 1978; Gordon et al., 1990).

En monos se han descrito diversos síntomas. La administración frecuente y repetida produjo desmielinización y necrosis del nervio óptico. La necrosis puede seguir a una dosis sencilla, o crónica con una prolongada inconciencia. Las lesiones en materia gris y blanca fueron menos frecuentes y severas. Las alteraciones en la corteza cerebral producidas por la azida inyectada involucraron ataxia debido a la destrucción cortical cerebral. También indujeron hiperquinesis e hipoquinesis que se correlacionaron con cambios morfológicos en el sistema nervioso central (Kleinhofs et al., 1978).

En mamíferos es un potente agente hipotensivo. Afecta la tasa y fuerza del corazón *in vivo*, al estimular los mecanismos cardiovasculares vagal y simpático (Kleinhofs et al., 1978; Gordon et al., 1990).

Quando se dió crónicamente a individuos hipertensos (0.6-1.3 mg, 3-4 veces diariamente por mas de 2 años), produjo un sustancioso descenso en la presión sanguínea hasta niveles normales. Dosis mayores de 4.0 µg/Kg producen convulsiones y muerte (Gordon et al., 1990).

Existen reportes acerca de la toxicidad por ingestión e inhalación en el ambiente ocupacional y por suicidas (Kleinhofs et al., 1978; Gordon et al., 1990). Stern (1927) describió un envenenamiento agudo por ácido hidrazoico en trabajadores de la

industria química que inhalaron accidentalmente sus vapores. Los principales síntomas registrados fueron: inflamación de las membranas mucosas, conjuntivitis y bronquitis, hinchazón de rodillas y articulaciones, lesiones en las piernas y pirexia (elevación de la temperatura por arriba de lo normal) en los últimos días. Köcher inhaló intencionalmente una solución de azida de sodio 1% y notó una caída en la presión sanguínea a 70/50 (Kleinhofs et al., 1978). En un caso en que se ingirieron 150 mg de azida de sodio en solución acuosa, los síntomas incluyeron fuertes dolores de cabeza, asfixia, pulso acelerado, náusea, vómito, diarrea, y paro cardíaco, los cuales desaparecieron en dos días (Gordon et al., 1990).

Efecto en las enzimas

Numerosas hemoproteínas, y otras enzimas que contienen cobre, zinc y otros metales son inhibidas por azida (Kleinhofs et al., 1978). La lista incluye enzimas dependientes de fosfato piridoxal o de grupos disulfuro (Tabla I).

En general la azida de sodio recuerda a la cianida por su especificidad de inhibición, pero existen notables diferencias. La estabilidad de los complejos metal-azida es muchas veces menor que la formada con cianida, y se requieren de altas concentraciones para su inhibición. Las afinidades relativas (K_i) para el citocromo c son 1.5×10^4 para azida (N_3^-) y 2×10^6 para cianida (CN^-). Las constantes de disociación para los complejos de citocromo oxidasa de mamíferos y para cianida son similares, 5 y 7×10^{-7} , respectivamente. La gran diferencia entre ellas consiste en los valores de pK , el cual se afecta en los extremos del pH fisiológico (Kleinhofs et al., 1978).

La azida de sodio inhibe a la catalasa, la respiración celular, la oxidación del citocromo c y la reacción indofenol de manera similar a KCN. Los efectos se deben principalmente a la interacción de azida con proteínas o enzimas del grupo hemo. La inhibición puede efectuarse al combinarse la azida con un sitio de

unión del metal en la forma de HN_3 , o en forma del compuesto iónico N_3^- . Cuando el ión azida está involucrado, el pH se ubica por arriba del rango fisiológico (7.5-8.5). Si está involucrado el ácido libre no disociado, el efecto del pH puede ser muy grande, y la inhibición se incrementa al disminuir el pH. Con base en estudios cinéticos y espectrográficos se considera que la azida reacciona con la catalasa y la citocromo oxidasa como ácido libre HN_3 . La azida reacciona con algunas hemoproteínas como ión disociado, como por ejemplo el citocromo c. La reacción es completamente reversible y una molécula de ferricitocromo c reacciona con un ión azida, N_3^- . Una azida férrica cataliza la autoxidación del ferricitocromo c (Kleinhofs et al., 1978).

Efecto en el metabolismo in vivo

En cebada y levaduras la captación de ácidos débiles como la azida está muchas veces limitada al ácido libre sin disociar y sin carga. Las variaciones del pH son importantes en los efectos respiratorios producidos por ácidos débiles; los efectos máximos de este inhibidor se observaron en valores de pH dos unidades abajo del pK del ácido inhibidor. El pK de azida está en un pH 4.8, así, los efectos máximos se observan en valores de pH cercanos a 3 (Nilan et al., 1973; Kleinhofs et al., 1978; Tomlinson, 1980).

En la cebada el crecimiento de semillas germinadas se redujo fuertemente sólo cuando el tratamiento con las soluciones de azida (12.5 mM) se ajustaron a un pH de 3. De igual manera, la actividad de la catalasa y peroxidasa de extractos de semillas de cebada fue inhibida en muestras tratadas con azida de sodio a un pH de 3 (Veleminsky et al., 1977).

En *E. coli*, la azida de sodio inhibió la fermentación pero no la respiración con piruvato o glucosa en células en reposo, así como en células proliferantes al usar succinato, piruvato ó hexosa fosfato, lo que sugiere la inhibición de la fosforilación oxidativa. Esta inhibición ha sido observada en fracciones mitocondriales de hígado de rata en las que azida provoca la

acumulación de un intermediario no identificado de la fosforilación oxidativa (De Flora et al., 1979).

Ciclo celular

La azida inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas en levaduras, dichos efectos tal vez estén relacionados con la inhibición general de la respiración y de la fosforilación oxidativa, lo que provocaría la falta de energía. En el caso de protoplastos de levaduras el principal efecto es la inhibición de la síntesis de proteínas, aunque en altas concentraciones se muestran otros resultados (Kleinhofs et al., 1978).

Sin embargo, en *Salmonella typhimurium* se ha observado que la azida puede inhibir directamente la síntesis de ADN en presencia de ATP exógeno, por lo que este efecto no se debería al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa o de la respiración (Kleinhofs et al., 1978).

El efecto principal de la azida (12 mM) en el ciclo celular de la cebada fue un retraso uniforme en el inicio del metabolismo después de la germinación, lo que a su vez provocó un retraso uniforme en la actividad mitótica, en el crecimiento de las semillas y en la síntesis de ATP y ADN, lo cual se interpretó como una deficiencia de ATP (Veleminsky et al., 1977).

En *E. coli*, concentraciones moderadas de este compuesto [5 mM], disminuyeron la incorporación de metionina debido probablemente al complejo que se forma entre la azida y la vitamina B12, una coenzima importante en la biosíntesis de la metionina (Kleinhofs et al., 1978; Tomlinson, 1980).

La azida despolariza las membranas de músculo de rana e inhibe la fototaxia en *Chlamydomonas reinhardi*. En conejos también interfiere con la agregación de plaquetas inducida por araquidonato, la formación de prostaglandinas y la agregación de de plaquetas inducida por ADP. En plaquetas humanas inhibe fuertemente la agregación dependiente de ADP y de epinefrina y termina completamente la agregación dependiente de colágeno. Algunos autores sugieren que la azida afecta alguna vía común para las

respuestas en plaquetas (Kleinhofs et al., 1978).

Activación de la guanilato ciclasa

En preparaciones de corteza cerebral, cerebelo e hígado de ratas, la azida incrementó los niveles de GMP cíclico y estimuló la actividad de la guanilato ciclasa, tanto soluble como particulada, de hígado y riñón, tuvo poco o ningún efecto en preparaciones de pulmón y corazón y disminuyó o desapareció el efecto cuando la guanilato ciclasa soluble de hígado se purificó o almacenó a bajas temperaturas. La azida [1mM] incrementó la actividad de la adenilato ciclasa de hígado, pero a un nivel mucho menor (Kleinhofs et al., 1978).

Se ha demostrado que en homogenados de hígado de rata se requiere de un factor macromolecular para la activación de la guanilato ciclasa por azida lo que provoca algunas alteraciones en las propiedades de la enzima: la especificidad del catión cofactor y del sustrato nucleotídico se modifican, la enzima activada puede utilizar Mg^{2+} , Mn^{2+} o Ca^{2+} y puede catalizar la formación de AMP cíclico de ATP. El mecanismo(s) de activación de la guanilato ciclasa se desconoce (Kleinhofs et al., 1978).

Mutagénesis

Las propiedades mutagénicas de la azida de sodio no están bien entendidas y los datos experimentales son contradictorios (Conger y Carabia, 1977; Veleminsky et al., 1979).

La mutagenicidad de la azida de sodio se asocia con el metabolito L-azidoalanina, compuesto fuertemente polar, soluble en agua, alcohol y dimetil-formamida, se recristaliza con gran dificultad; la enzima o-acetilserina sulfidrilasa está involucrada en su transformación (Owais et al., 1981b).

La L-cisteína inhibe específicamente la síntesis del metabolito, mientras que la o-acetil-L-serina revierte esta inhibición, lo cual sugiere que puede transformarse o ser requerida para la

síntesis del metabolito (Owais et al., 1981a).

Existen varios reportes de los efectos mutagénicos de la azida de sodio en diferentes organismos (Tabla II).

El tratamiento con azida en *Staphylococcus aureus* incrementó ligeramente la frecuencia de mutantes resistentes a la penicilina y estreptomina (Nilan et al., 1973).

En condiciones *in vitro* la azida [1 M] no induce mutaciones, entrecruzamiento o mal apareamiento de bases en el sistema de transformación de *Bacillus subtilis*, así como en la prueba de renaturalización (Kleinhofs et al., 1975).

En *Salmonella typhimurium* concentraciones de 1.0 M y 100 mM inducen revertantes his⁺ en cepas deficientes en reparación por escisión (uvrB) en his G46, y en cepas resistentes al 5-fluoruracilo deficientes en reparación por escisión (uvrA) de *E. coli* B/r WP2. En cepas que presentan reparación por escisión la azida fue sólo un mutágeno débil (Kleinhofs y Smith, 1976). También resultó mutagénica en *S. typhimurium*, al inducir la sustitución de pares de bases que no fueron incrementadas por el plásmido pKM101 (factor R). Sin embargo, en el mismo ensayo la mutagenicidad de la azida de sodio (0.1-100 µg/placa) fue disminuida por enzimas de fracciones post-mitocondriales de hígado de rata dependientes del sistema de generación de NADPH. La preincubación con jugo gástrico de seres humanos también disminuyó la mutagenicidad de la azida (De Flora et al., 1979).

En semillas de cebada tratadas con azida de sodio (a 1 mM y pH=3) se incrementó la frecuencia de mutación (P<0.05), pero a pH=11 no tuvo efecto (Nilan et al., 1973).

En otro reporte, con semillas de cebada premojadas, la azida de sodio (1 - 50 mM) a un pH 3, incrementó de acuerdo con la dosis la frecuencia de rompimientos sencillos de cadenas de ADN de embriones no germinados. La dosis aplicada también inhibió, la germinación de las semillas. En dosis subletales (10 y 12.5 mM) la azida indujo una baja frecuencia de rompimientos de cromátidas y traslocaciones en células de la raíz (Veleminsky et al., 1977).

En maíz, se comparó la efectividad y eficiencia de azida de

sodio (1 mM) y etil metanosulfonato (EMS) para inducir mutaciones somáticas en el locus *yg2* en semillas de dos diferentes estados metabólicos y poblaciones celulares: 1) en latencia (no mojadas) y 2) premojadas (72 h a 20°C) y heterocigóticos para el locus *yg2*. La frecuencia de sectores *yg2* en hojas se incrementó al aumentar la concentración de los mutágenos en las semillas (premojadas y no mojadas). Ambos mutágenos fueron más efectivos en las semillas premojadas; la azida indujo mutaciones en maíz en la prueba del locus *Yg2/yg2*, pero en una frecuencia mucho menor que la inducida por EMS, o por radiaciones ionizantes. Apparently la azida no es tan efectiva en este sistema como en el de mutantes de cebada deficientes en clorofila (Conger y Carabia, 1977).

Owais et al., (1978) fueron los primeros en dar evidencia experimental de la presencia de un metabolito mutagénico formado in vivo en embriones de cebada expuestos a azida de sodio. Trataron semillas Himalaya con azida (1 mM) en un buffer de fosfato 100 mM por 2 h. Los extractos de embriones tratados con azida fueron altamente mutagénicos para la cepa TA 1530. Además, la mutagenicidad se incrementó en semillas germinadas, en comparación con las no germinadas (Sander et al., 1978).

Extractos de embriones de cebada tratados con azida [1 mM] fueron mutagénicos para una cepa de *S. typhimurium* deficiente en reparación por escisión; también indujeron mutantes resistentes a ciclohexamida en células de crecimiento de la línea *rad2-5* en *Saccharomyces cerevisiae*. El dializado diluido 1:1 con medio completo a pH 4.2 e incubado por 72 h, incrementó de 100 a 200 veces la frecuencia de mutantes por arriba de la frecuencia espontánea; el rango de pH 4-5 (ácido) fue más efectivo que a pH 9 (Veleminsky et al., 1979).

La sensibilidad de bacterias gram-negativas a azida es anulada por las mutaciones *cysK* y *cysBc* (el primero es el gene estructural de la o-acetilserina sulfidrilasa y el segundo, el gene regulador de la biosíntesis de enzimas de L-cisteína). Las enzimas de la vía biosintética de L-cisteína, con excepción de la serina transacetilasa, son reprimidas en la presencia de L-cisteína.

ciesla y Filutowicz (1979) sugirieron que si la azida fuera el sustrato de una de las enzimas biosintéticas de L-cisteína, la inhibición de la enzima, por la L-cisteína, podría disminuir la tasa de transformación metabólica de azida, y en consecuencia se reduciría la concentración del mutágeno reactivo (L-azidoalanina). Para definir lo anterior construyeron la línea TK 1825 que tiene además, las mutaciones *uvrB* e *hisG46*, y *cys B1352*. La mutación *cysB1352* provoca la síntesis constitutiva de enzimas de la biosíntesis de L-cisteína y, al agregar cisteína a esta mutante, se reduce significativamente la tasa de mutación inducida por azida en esta cepa.

La azida de sodio en concentraciones de 3.5 a 100 mM, con diferentes valores de pH no incrementó la frecuencia de mutaciones en la región adenina-3 (*ad3*) en restos de conidios y en conidios completos que crecen en cultivos de heterocariontes 12 y 59 de *Neurospora crassa* (Tomlinson, 1980).

Al usar la prueba de letales recesivos ligados al sexo en machos de *Drosophila melanogaster* no hubo un incremento significativo en la frecuencia de mutación después de la inyección de soluciones bufereadas de azida (0.1, 1.0 y 5 mM) a pH de 3.8 o 4.6. Sin embargo se observó un débil efecto mutagénico en moscas que fueron alimentadas por 3 días con azida (0.1 mM) a pH=4.6 (Kamra y Gollapudi, 1979). En la prueba de mutación y recombinación somática en las alas de *Drosophila*, larvas de tercer estadio tratadas durante 6 h por alimentación-contacto de azida (7.3 - 14.7 mM) mostraron una respuesta débil positiva (Delgado, 1990). Se ha determinado que este organismo presenta niveles significativos de la enzima o-acetilserina-sulfidrilasa (Rosichan et al., 1983).

La azida de sodio actuó como citostático y como citotóxico en dos líneas celulares de mamífero: fibroblastos humanos EUE y de criceto chino V79. Después de la aplicación de azida [30, 100 y 300 µg/ml] en un medio ácido, se observó el efecto citostático más alto. Los resultados de la prueba de inhibición de síntesis de ADN sugirieron que la azida no daña el ADN de fibroblastos. En células de criceto chino, el tratamiento con 20 o 60 min de exposición en

un medio ácido no incrementó la frecuencia de mutaciones, sugiriendo que el efecto citostático de la azida de sodio en los fibroblastos estudiados no es acompañado por un daño genotóxico (Slamenova y Gabelova, 1980).

El efecto de la azida se estudió en dos líneas celulares V79 (una línea epiteloide derivada de pulmón de criceto chino) y V7979 (una sublínea deficiente en reparación del ADN de V79), siendo la azida más efectiva en mutantes de la línea celular V7979 que en la línea progenitora V79. Esta diferencia es probablemente sobreestimada en el ensayo *in situ* debido al posible incremento metabólico cooperativo que ocurre en V7979, por la disminuida citotoxicidad mostrada por la azida hacia esta línea celular, por lo que se concluyó que la azida de sodio es mutagénica en células de roedores y probablemente, también en las de otros mamíferos, incluyendo al hombre (James et al., 1980).

Para determinar si la azida produce intercambio de cromátidas hermanas (ICH) se emplearon células sanguíneas de seres humanos y de criceto chino K1 que se expusieron por 4 y 2 h respectivamente a varias concentraciones de azida desde 1 mM hasta 0.0001 mM. Concentraciones mayores que 0.1 mM en tratamientos de más de 4 h indujeron letalidad en linfocitos humanos y en la línea celular K1 concentraciones mas bajas no incrementaron la frecuencia de ICH por arriba de los controles. Pero la azida a 5 y 50 mM en tratamientos de 1 h incrementó ($P < 0.05$) la frecuencia de ICH (Arenaz y Nilan, 1981).

En otro estudio, células V79 se trataron con azida o su mutágeno(s) proximal(es) por 2 o 6 h, respectivamente, y se analizaron por elución alcalina para detectar rompimientos de cadena sencilla. Los datos mostraron que ni la azida ni el mutágeno proximal (L-azidoalanina) indujeron rompimientos de ADN de cadena sencilla, o entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas en concentraciones de 0.1, 1.0 y 100 mM. Por lo que al parecer ni la azida ni su mutágeno proximal interaccionan directamente con el ADN.

Antimutagénesis

La mutagenicidad de azida de sodio para sistemas eucariontes se reconoció inicialmente en plantas (Nilan et al., 1973), especialmente en valores bajos de pH (alrededor de 3). En contraste, varios reportes muestran que a pH neutro azida presenta actividad antimutagénica del daño inducido por compuestos N-nitrosos en plantas superiores (Tabla III) (Gichner y Veleminsky, 1988).

En *E. coli* la azida previno la acción letal, la inhibición de la síntesis y la degradación de ADN producida por *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) y *N*-metil-*n*-nitrosouretano (MNUA). Sin embargo, no tuvo ningún efecto en la actividad mutagénica de metilmetanosulfonato (MMS). La acción de MNU no pudo ser prevenida por algunos inhibidores específicos de la síntesis del ADN (hidroxiurea), ARN (azouracil) y proteínas (cloranfenicol), mientras que el efecto de MNUA fue revocado con hidroxiurea, probablemente por su influencia en la descomposición del MNUA. Por el contrario, la acción protectora de la azida de sodio no fue el resultado de una reacción entre este inhibidor respiratorio y el MNU y MNUA (Gichner y Veleminsky, 1988).

En ratón, la azida de sodio evitó el efecto de una dosis letal aguda de rayos X, pero sólo si la azida era inyectada antes y no después de la radiación (Kleinhofs et al., 1978).

SISTEMAS DE PRUEBA

Los efectos genéticos de los mutágenos pueden variar entre especies e individuos, así como en diferentes tipos y estados celulares en el mismo individuo, dependiendo del metabolismo, la reparación del ADN, la dosis del mutágeno, y otros. En vista de esta diversidad en la respuesta es importante establecer los principios generales de acción de los compuestos xenobióticos (Vogel, 1991).

En el caso de los seres humanos el primer paso consiste en la identificación del daño potencial de los agentes a los que están expuestos. Esta identificación se obtiene a partir de la información clínica y de la epidemiológica. Este proceso se complementa con estimaciones toxicológicas, como el análisis sistemático de las relaciones estructura química-actividad genotóxica, los resultados de pruebas a corto plazo *in vitro* y de bioensayos con animales a corto y largo plazo, tanto *in vivo* como *in vitro*. La figura 10 muestra algunos organismos que se usan rutinariamente en la evaluación de agentes genotóxicos.

Aunque se han desarrollado principios y procedimientos en la predicción de toxicidad para los seres humanos, la diversidad de las reacciones tóxicas y las variaciones entre las diferentes especies son considerables, por lo que la confiabilidad de estas aproximaciones deben tomarse con reserva (Fig. 11).

La información derivada de estudios de genotoxicidad constituye una valiosa contribución en la evaluación de compuestos químicos. Así, se considera que compuestos que no muestran actividad en una serie de bioensayos y a diversas concentraciones, no son genotóxicos.

Una familia de enzimas implicada con frecuencia en la activación de compuestos son las enzimas dependientes de citocromo P450.

Los citocromos P450s son hemoproteínas unidas a la membrana que se encuentran en gran parte de los organismos. En mamíferos existen dos clases funcionales distintas de P450: (i) las enzimas esteroidogénicas de tejidos especializados, tales como el adrenal, gonadal y placentario, y (ii) las responsables de la oxidación de gran número de compuestos extraños como drogas, pesticidas y otros contaminantes ambientales.

Los P450s constituyen una superfamilia de 50 a 200 genes. Existen muchos casos donde los genes son ortólogos (genes en dos o más especies que tienen el mismo ancestro). Una proteína dentro de una subfamilia presenta menos del 40% de aminoácidos similares con genes de otras subfamilias, mientras que dentro de la misma

subfamilia manifiestan al menos 59% de similitud (González et al., 1991).

La identificación y caracterización de la diversas formas de citocromos P450 que activan y/o desintoxican compuestos xenobióticos, permite determinar las variaciones que confieren en relación a la susceptibilidad individual (González et al., 1991).

MECANISMOS DE TRANSFORMACION METABOLICA

En los vertebrados, la transformación metabólica de los compuestos xenobióticos se realiza principalmente en las células del hígado, y es catalizada por enzimas localizadas en las fracciones solubles, mitocondricas y microsómicas; también se llevan al cabo, aunque en menor grado, en células del riñón, pulmón, placenta, sangre y aún en la flora intestinal.

Las transformaciones bioquímicas catalizadas por enzimas se pueden clasificar en 4 categorías principales: a) oxidaciones, b) reducciones, c) hidrólisis y d) conjugaciones (Fig. 12).

La biotransformación de una sustancia puede ocurrir por varias vías en reacciones sencillas o múltiples. Si la vía metabólica consiste en una sola reacción, es probable que implique oxidación, reducción o hidrólisis, reacciones que tienden a aumentar la polaridad del compuesto; las reacciones múltiples pueden involucrar oxidaciones, reducciones e hidrólisis. La reacción final es, por lo general, una reacción de conjugación que involucra la inserción de grupos funcionales endógenos, que habitualmente aumentan la polaridad y reducen la liposolubilidad de la molécula, razón por la cual pueden excretarse con mayor facilidad.

Oxidaciones microsómicas de función mixta

El metabolismo de una gran variedad de compuestos extraños involucra procesos oxidativos. Por oxidación microsómica se entiende a las reacciones catalizadas por las enzimas de los microsomas del retículo endoplásmico, estas enzimas se denominan

oxigenasas microsómicas de función mixta (mono-oxigenasas). Las reacciones requieren de oxígeno molecular y de fosfato de nicotinamida adenina-dinucleótido, en forma reducida (NADPH). Los equivalentes reducidos a base de NADPH participan, a su vez, en la reducción del oxígeno molecular, de modo que pueda ser transportado por un citocromo denominado P-450 al compuesto por oxigenar, después el oxígeno se fija en los compuestos, habitualmente como grupo hidroxilo.

La secuencia aparente de fenómenos en el curso de una oxidación de función mixta es la siguiente. El compuesto (sustrato) forma un complejo con el citocromo P-450 oxidado; este complejo es reducido directamente por la NADPH citocromo-c-reductasa, o bien, indirectamente por conducto de un electrón portador no identificado. El complejo reducido de citocromo P-450•sustrato reacciona con el oxígeno para formar un complejo "oxígeno activo", que se descompone con la formación del sustrato oxidado y citocromo P-450 oxidado (OMS, 1980).

Reacciones de conjugación

Los principales mecanismos de conjugación son: síntesis de glucoronidos, síntesis de sulfato "etéreo", conjugación de glutatión, conjugación de glicina, metilación, acetilación y síntesis de tiocianato. En el hombre y en el simio también, se ha observado la conjugación de glutamina. Los conjugados formados por estos mecanismos son, en general, atóxicos, razón por la cual se ha considerado que la conjugación también es un mecanismo de desintoxicación.

Estas conjugaciones son reacciones biosintéticas en las cuales los compuestos extraños o sus metabolitos que contienen grupos apropiados (hidroxilo, amino, carbonilo o epóxido) se combinan con algunos sustratos endógenos para formar conjugados. Estas reacciones requieren de ATP como fuente de energía, coenzimas y transferasas que por lo general son específicas para la formación de conjugados de los compuestos extraños (OMS, 1980).

Transformaciones metabólicas extramicrosómicas

Los compuestos transformados por oxidación o con grupos característicos iniciales (hidroxilo, amino), pueden ser similares a los constituyentes normales del metabolismo fisiológico, por lo que pueden sufrir transformaciones metabólicas análogas a las de los constituyentes normales del organismo: oxidación, reducción, desaminación e hidrólisis. Las enzimas catalizadoras de estas reacciones están localizadas en el citosol o son compuestos intrínsecos de las mitocondrias.

Reacciones no enzimáticas

Son las reacciones espontáneas entre las sustancias químicas y los constituyentes naturales del cuerpo que llevan a la formación de metabolitos, por ejemplo, la reacción de un agente alquilante con el glutatión.

Drosophila melanogaster

La "mosca de la fruta", *Drosophila melanogaster*, es el eucarionte más estudiado y por tanto, el mejor conocido desde el punto de vista genético. Desde que Morgan en 1911 introdujo el empleo de este organismo en la investigación genética, se utiliza como modelo biológico en diversas disciplinas científicas.

Entre las ventajas que se señalan para su uso destacan: la facilidad para realizar cultivos experimentales, la corta duración de su ciclo de vida, la gran cantidad de descendencia que produce una pareja, y también el hecho de que su mantenimiento requiere poco espacio y es de costo reducido. Tiene un número cromosómico bajo ($2n=8$) y las larvas presentan cromosomas gigantes en sus glándulas salivales, por lo que son de gran utilidad en estudios de la morfología cromosómica, de evolución cariotípica y de la transcripción.

Otra ventaja es que posee complejos enzimáticos semejantes a los que se presentan en la fracción S9 del hígado de los mamíferos,

los cambios genéticos inducidos que se detectan en *Drosophila* son similares a los encontrados con los sistemas de prueba de mamíferos; existen además gran cantidad de líneas mutantes, entre las que se incluyen mutantes metabólicas o con diferentes capacidades para biotransformar xenobióticos, y muchas otras expresiones que han contribuido a extender su empleo a diversas disciplinas científicas (Hällstrom et al., 1984; Hernández, 1993; Ramos et al., 1993).

El desarrollo de *D. melanogaster* implica un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que anteceden una metamorfosis completa (holometábola), de la que finalmente surge un imago o adulto. La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son: huevo, un día; larva de primer estadio, un día; de segundo, un día, y de tercero, dos días; pupa, 4.5 a 5 días. Así, la duración del ciclo de vida completo es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, 25°C y 60%, respectivamente.

La larva presenta dos linajes celulares diferentes: las células larvarias y las imagales. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan su volumen; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las segundas no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva y se distinguen de las primeras, porque las células imagales tienen tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retienen la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra a la metamorfosis; éstas células se localizan en estructuras características denominadas discos imagales, los cuales son primordios celulares que incrementan su tamaño al multiplicarse el número de células mediante divisiones mitóticas que ocurren en momentos particulares durante el desarrollo larvario.

SMART

Para realizar la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en células de las alas de *Drosophila melanogaster* se requieren larvas transheterocigóticas para dos marcadores recesivos localizados en el tercer cromosoma, y que controlan la expresión de los tricomas o células diferenciadas: múltiples pelos en el ala (*mwh*) y flare (*flr³*); así, si durante el desarrollo de las alas ocurren cambios en la información de las células, se formarán clones que se harán evidentes a través de la expresión fenotípica de los tricomas (García-Bellido y Merriam, 1971).

En *Drosophila* se ha demostrado la presencia de un sistema tanto constitutivo como inducible de citocromos P450, así como la variación génica en el metabolismo, toxicidad y sensibilidad a la mutagénesis por carcinógenos indirectos (Hällstrom et al., 1984; Zijlstra y Vogel, 1988; Frölich y Würigler, 1991; Graf et al., 1991; Graf y Van Schaik, 1992).

Hällström et al. (1984) mostraron que la línea Oregon R (ORR) posee un alto nivel constitutivo de citocromo P450 y determinaron que el principal gen responsable (R) para la capacidad de alta bioactivación está a 65.0 unidades de mapa en el cromosoma II.

En un intento para mejorar la prueba del ala para la detección de promutágenos activados vía metabolismo dependiente del citocromo P-450, Frölich y Würigler (1991) construyeron dos nuevas cepas de *Drosophila*. Estas cepas llevan en el cromosoma I y II, genes que les confieren la resistencia al DDT, la línea Oregon R (R) se caracteriza por tener un alto nivel constitutivo del citocromo P450.

Sin embargo, esta cruce (de alta bioactivación, HB) mostró varias desventajas para su aplicación, tales como un arreglo no uniforme de los tricomas de las alas en ciertas áreas, lo que complicó la clasificación de las manchas, y un retraso en el desarrollo de la larva (Frölich y Würigler, 1991).

Los problemas encontrados en la cruce HB se pueden resolver al usar la cruce HB mejorada en la cual hembras ORR;*flr³*/TM₆, Ser se

cruzan con machos mwh/mwh estándar. La progenie es heterociga para el gene R del cromosoma II y muestra una capacidad de bioactivación dependiente del citocromo P450 equivalente a la de la cruce original HB (Graf et al., 1991; Graf y Van Schaik, 1992), pero no manifiestan las alteraciones en la patrón de los tricomas por lo que se concluyó que la capacidad de bioactivación es dominante, mientras que los patrones de los tricomas se deben a genes recesivos. Además estos individuos se desarrollan normalmente y emergen en el mismo tiempo que las estándar.

También se observó que la frecuencia de manchas obtenidas con la cruce estándar y con la cruce HB mejorada son prácticamente las mismas. Esto indica que las características de las larvas de la cruce mejorada HB son similares a las de la cruce estándar, con excepción de la alta capacidad de bioactivación (Graf y Van Schaik, 1992).

En esta tesis se planteó como objetivo general: Determinar el efecto del metabolismo en la respuesta genotóxica de la azida de sodio en las células del ala de *Drosophila melanogaster*.

Se plantearon además los siguientes objetivos particulares:

- 1) Determinar la respuesta mutagénica inducida por azida de sodio en células somáticas de cepas estándar de *D. melanogaster*.
- 2) Determinar la participación del metabolismo en mutagénesis de la azida de sodio al emplear una cepa de alta bioactivación en la misma prueba.

MATERIAL Y METODO

Pruebas preliminares

Para obtener la LC_{50} , machos silvestres de la línea Canton-S fueron expuestos por un período de 48 horas a diferentes concentraciones de azida de sodio en tubos homeopáticos con papel filtro y 0.3ml de la solución. La LC_{50} se ubicó aproximadamente en 5 mM, sin embargo, al dar un tratamiento crónico esta concentración fue muy tóxica para las moscas, lo que obligó a seleccionar concentraciones más bajas.

A pesar de esto, el tratamiento crónico (0 x 120), resultó sumamente tóxico, por lo que se redujo el tiempo de exposición a 48 h y se utilizaron larvas de 72 ± 4 h de edad. El compuesto se administró sobre la superficie del medio de cultivo elaborado de acuerdo a Ramos et al., (1993). Este protocolo tiene la desventaja de que la concentración del compuesto en el alimento no es uniforme, por lo que se decidió utilizar tubos homeopáticos con 1 gr de medio instantáneo (Carolina Biological Supply Co., Burlington, N.C., USA) y 5 ml de la solución de prueba.

Las concentraciones finales utilizadas fueron: 0.50, 0.63, 0.75, 0.88 y 1.0 mM. En cada caso las soluciones se prepararon antes de cada experimento. Como solvente y control negativo se utilizó agua destilada.

Para conocer el grado de acidez en que se trabajó, se realizó la determinación del pH de las soluciones mediante el empleo de papel indicador. Se efectuaron dos mediciones, la primera de ellas después de preparar la solución y la segunda después de agregarla al medio instantáneo, el valor en ambas determinaciones fue siempre de 6.5, aproximadamente. La azida de sodio (NaN_3) se obtuvo de Merck.

Cruzas y marcadores

Se utilizaron dos cruzas progenitoras:

- 1) Cruza estándar: ♀♀ $flr^3/TM3$, Ser X ♂♂ mwh/mwh
- 2) Cruza metabólica: ♀♀ $ORRflr^3/TM3$, Ser X ♂♂ mwh/mwh

$flr^3/TM3$, Ser .- el marcador "flare" se localiza a 39 unidades de mapa en el cromosoma III, se identifica fenotípicamente por presentar tricomas en forma de flama en torax y abdomen (García-Bellido y Dapena 1974; Lindsley y Zimm, 1979). En condición homocigota es letal; para el mantenimiento de esta línea se emplea un cromosoma balanceador (el término balanceador se utiliza para designar el arreglo en el cual se involucran dos genes letales en el mismo par homólogo) (Gardner, 1988). Este cromosoma es $TM3$, Ser, el cual presenta una inversión pericéntrica que abarca gran parte del cromosoma III; porta el marcador "Serrata" (Ser), que por ser dominante permite reconocer a los individuos que llevan la inversión ya que en ellos las alas tienen muescas en los bordes. El marcador serrata también es letal en condición homocigota, por lo que en esta craza sólo es posible recobrar individuos heterocigotas tanto para flr^3 como para Ser.

mwh .- el marcador "multiple wing hairs", se encuentra en el cromosoma III a 0.0 unidades de mapa, se reconoce fenotípicamente porque altera el número de tricomas por célula, en lugar de uno en el fenotipo silvestre, se presentan tricomas múltiples (Lindsley y Grell, 1968).

Sincronización

Tres días después de realizada la craza, los progenitores se transfirieron a frascos con medio de cultivo nuevo y se colectaron huevos por un período de 8 h.

Tratamiento

Larvas de 72 ± 4 hs se extrajeron por el método de Nöthinger (1970), se enjuagaron y se colocaron en tubos homeopáticos con 1.0 g de medio instantáneo (Carolina) y 5 ml de la solución de azida de sodio donde permanecieron hasta que emergiera el imago, lo cual corresponde a un período de alimentación de 48 h. Para cada concentración se realizaron al menos tres repeticiones.

Análisis al microscópio

Los adultos +flr³/mwh+ se fijaron en alcohol al 70 %. Para la elaboración de laminillas las alas se montaron utilizando solución Faure.

El registro de manchas se efectuó con un microscopio de observación a 40 X. Por el tamaño se clasificaron en chicas (de 1 a 2 células) y grandes (> 2 células), y por el fenotipo en manchas simples mwh, manchas simples flr³ y manchas gemelas, con los dos fenotipos anteriores (Graf et al., 1984).

Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y el lote testigo se utilizó el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988), y el programa de cómputo SMART (Würgler, no publicado).

RESULTADOS

Para cada concentración se realizaron al menos tres series de experimentos y al no encontrarse diferencias significativas entre las repeticiones, se sumaron los resultados obtenidos, tanto con la cepa estándar como con la metabólica.

La frecuencia de manchas inducidas por azida de sodio en ambas cruza se muestran en la tabla IV y figuras 13 y 14.

La figura 13 muestra la distribución de la frecuencia de manchas simples chicas y grandes, gemelas y totales inducidas por azida de sodio en moscas de la línea estándar. En general, la respuesta es proporcional a la concentración utilizada. La frecuencia de manchas simples grandes y la de manchas totales se incrementó significativamente ($P < 0.05$) en todas las concentraciones de azida de sodio. Para manchas simples chicas y manchas gemelas el incremento en la frecuencia fue estadísticamente indeterminado a 0.50 y 0.63 mM, y positivo a partir de la concentración 0.75 mM ($P < 0.05$).

En la figura 14 se presenta la distribución de manchas inducidas por azida de sodio en la cepa de alta bioactivación. En general, la inducción de manchas fue menor que con la cruza estándar; sólo se incrementó la frecuencia de manchas totales con 0.63 mM y manchas simples grandes con 0.63, 0.88 y 1.0 mM de azida de sodio ($P < 0.05$).

DISCUSION

Existen numerosos trabajos que describen la acción indirecta de la azida de sodio. Las primeras evidencias se obtuvieron en plantas, en las que se asoció su actividad mutagénica con la acumulación de peróxido de hidrógeno y la sustitución de bases (Nilan et al., 1973).

Posteriormente Kleinhofs et al. (1975), llegó también a la conclusión de que la azida de sodio es un mutágeno que actúa por sustitución de bases en *S. typhimurium*, esta respuesta mutagénica se atribuyó a la acción indirecta del ácido hidrazoico, que en estudios *in vitro* reveló una alta despurinación del ADN con liberación preferencial de adenina. Es probable que la despurinación se asocie también con efectos *in vivo*.

Otros mecanismos alternativos que han sido propuestos son: incremento en los peróxidos, activación *in vivo* e incremento en la inducción de errores durante la replicación (Nilan et al., 1973; Conger y Carabia, 1977; Kleinhofs et al., 1975); sin embargo, no se considera necesaria la replicación del ADN para la acción mutagénica de azida, al menos en bacterias (Ciesla y Fiutowics, 1979; Tomlinson, 1980).

Los resultados obtenidos con la cruz estándar sugieren que la azida de sodio es un mutágeno positivo de acción directa, ya que incrementó de manera consistente la frecuencia de manchas grandes, las cuales son un indicador del tiempo de acción de un compuesto, en relación con la edad de las larvas, al momento del tratamiento. También se observó un incremento significativo en la frecuencia de manchas gemelas, a partir de 0.75 mM, lo que indica que induce recombinación somática. La misma respuesta se observó en las manchas simples chicas. En general, la respuesta positiva de la azida de sodio se observa en la frecuencia de manchas totales. Hubo una relación directamente proporcional entre la frecuencia de manchas inducidas (de cualquier tipo) y la concentración, es decir, los incrementos en la concentración implican incrementos en la frecuencia de manchas (Fig. 13).

Delgado (1990) probó azida de sodio con la prueba SMART de *Drosophila*. Utilizó larvas de 72 ± 4 h a las que trató con concentraciones variables de la azida [7.3 - 14.7 mM] durante 6 h y no observó un efecto mutagénico definido, sin embargo, esto puede deberse a la corta duración del tratamiento.

De manera similar, la baja capacidad de la azida (1 mM) para inducir sectores mutantes en semillas de maíz, fue atribuida a que no fueron tratadas el tiempo óptimo durante el ciclo celular, aunque también es probable que se deba a la baja efectividad del compuesto para inducir aberraciones cromosómicas (Conger y Carabia, 1977).

En *Saccharomyces cerevisiae* la baja efectividad de un extracto dializado de embriones de semillas de cebada tratadas con azida (1 mM) se relacionó también con la corta duración del tratamiento y

probablemente, quizá también con la reducida ingestión del compuesto, por lo que algún sistema de transporte con requerimientos de energía podría estar involucrado (Veleminsky et al., 1979).

Con respecto a la intensidad de los tratamientos en relación con su duración, se ha observado que, de manera general, la relación entre un tratamiento agudo (como el utilizado por Delgado, 1990) y uno crónico (como el de este trabajo) es un orden de magnitud menor, de manera que en un tratamiento crónico se incrementa considerablemente el daño inducido.

De acuerdo con Graf et al. (1984) en general el tratamiento crónico de 72 X 48 h es el óptimo, debido a que en esta modalidad de exposición se encuentra la mayor frecuencia de manchas (gemelas y totales). En estadios más tempranos del desarrollo algunos compuestos provocan la muerte de las larvas, y en larvas de mayor edad, la cantidad de alimento ingerido es menor y, en consecuencia, la magnitud de la respuesta también es menor.

En semillas premojadas de cebada también se observó una relación directamente proporcional entre la frecuencia de mutación y la concentración de este agente. Aunque los numerosos experimentos hechos en cebada sugieren que su acción mutagénica es puntual (Sander et al., 1978).

Mutágeno negativo

Existen reportes donde la respuesta de este compuesto químico ha sido negativa. No produce efectos genotóxicos en el ADN de fibroblastos humanos y de criceto chino (Slamenova y Gabelova, 1980). En concentraciones de 50 mM y 5 mM, incrementó ligera pero no significativamente, la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos y en células de criceto chino. Sin embargo, este incremento se asoció a la probable inhibición de la catalasa y la peroxidasa, las cuales serían responsables del incremento de peróxido de hidrógeno, un conocido inductor de ICH

(Arenaz y Nilan, 1981).

En otro estudio con las mismas líneas celulares el metabolito de azida (azidoalanina) incrementó significativamente la frecuencia de ICH, lo que implica que este agente es un mutágeno de acción indirecta y que tal vez los resultados negativos en la inducción de rompimiento de cadena sencilla, así como de entrecruzamiento en el ADN podrían atribuirse, a la incapacidad de este compuesto para atravesar la membrana celular; aunque estudios con radiactividad han mostrado que el metabolito sí ingresa (Arenaz et al., 1983).

Existen otros factores que pueden influir de alguna manera en los resultados de los diversos experimentos, tales como el uso de diferentes sustancias amortiguadoras en cada uno de ellos y la fuente de los reactivos, pues esto puede causar algunas variantes en la respuesta mutagénica (La Velle y Mangold, 1987).

Mutágeno indirecto

Los primeros resultados positivos de la mutagenicidad de azida de sodio consideraban la posibilidad de que este compuesto actuara de manera indirecta al inhibir la catalasa y peroxidasa permitiendo así la acumulación de peróxido de hidrógeno el cual sería el verdadero mutágeno (Kleinhofs et al., 1975).

Experimentos *in vitro* con ADN de esperma de salmón expuestos a azida de sodio mostraron una liberación de purinas, preferentemente adenina, lo que puede ser el resultado de la sustitución de pares de base. Sin embargo los experimentos *in vitro* con ADN de *Bacillus subtilis* indicaron que el modelo de despurinación no se lleva a cabo, se sugirió entonces que la azida debe ser activada o metabolizada al agente mutagénico último (Kleinhofs et al., 1975).

El grupo de Veleminsky observó que una sustancia de bajo peso molecular (metabolito), que se formaba en semillas de cebada tratadas con azida de sodio, inducía mutaciones no sólo en bacterias, sino también en microorganismos eucarióticos como

levaduras (Veleminsky et al., 1979).

Owais et al. (1981b) presentaron evidencia experimental de la formación *in vivo* de un metabolito en cebada.

En bacterias y en sistemas de plantas se demostró que la azida es metabolizada a un intermediario mutagénico estable. La Velle y Mangold (1987) sugirieron que este metabolito es beta-azidoalanina (AZAL). Se han presentado considerables datos que apoyan lo anterior, incluyendo el aislamiento y la caracterización química del metabolito formado *in vivo* (Owais et al., 1981 a y b).

Antimutágeno

En la cepa de alta bioactivación puede observarse (Fig. 14) que en la concentración más baja [0.5 mM] la frecuencia de mutación está por abajo de la tasa espontánea, aún cuando la diferencia no es significativa. Esto podría estar relacionado con posibles propiedades antimutagénicas de este compuesto, ya que varios artículos han reportado que la azida de sodio en un pH neutro mostró actividades antimutagénicas contra compuestos *n*-nitrosos, sin embargo habría que probar la azida con algún alquilante para mostrar su capacidad antimutagénica (Gichner y Veleminski, 1988).

Efecto del pH

La mutagenicidad de este agente en sistemas eucarióticos se reconoció inicialmente en plantas, especialmente en niveles de pH ácido. EL pK de azida de sodio está en un pH 4.8 ($k_a=2 \times 10^{-5}$); así en un pH 3 la especie predominante es azida de hidrógeno (HN₃). Se ha considerado que la gran efectividad en la forma ácida es debida a la mejor penetración de las membranas celulares por la molécula neutral HN₃.

Veleminsky et al. (1977) no excluyen la posibilidad de que el origen espontáneo de rompimientos de cadena sencilla en cebada sea

causado por el descenso del pH, y consecuentemente por la presencia de ácido hidrazoico.

Nilan et al. (1973), señalaron que la efectividad mutagénica de la azida es mayor cuando se usa en pH3. Aunque el pH se ajustó al nivel recomendado, Coger y Carabia (1977) no encontraron mutaciones en maíz.

En plantas superiores, la azida de sodio es mutagénica sólo a valores bajos de pH, sin embargo en *S. typhimurium* no se necesitó de un pH ácido para obtener una respuesta mutagénica .

En *N. crassa* no se detectó una dependencia entre el pH y la mutagenicidad en varios valores de pH (3-8), además no causó un incremento significativo en la frecuencia de mutaciones (Tomlinson, 1980).

En *Drosophila* al usar la prueba de letales recesivos ligados al sexo se seleccionaron concentraciones para tener el 100% de sobrevivencia al final del tratamiento y se observó que este organismo puede tolerar concentraciones más altas en pHs básicos. Es posible que la concentración a la que se trató a las moscas (0.1 mM, 1.0 mM y 5.0 mM), sin matarlas, no haya sido suficiente para inducir una frecuencia de mutación significativa, y que a concentraciones relativamente bajas pueden llevarse a cabo procesos de reparación celular (Kamra y Gollapudi, 1979).

En *D. melanogaster* y en células de ratón se consideró la posibilidad de que se requieran valores bajos de pH para provocar altas frecuencias de mutaciones, sin embargo, en valores bajos de pH, la azida de sodio es muy tóxica. Por estas razones, se consideró que los resultados negativos en la prueba de letales recesivos ligados al sexo se debían a que la concentración de azida necesaria para inducir mutaciones en pHs ácidos era letal.

Los resultados positivos obtenidos en este trabajo en la prueba SMART, indican que no es necesario un pH ácido para detectar la mutagénesis de azida, ya que el pH de este tratamiento fue cercano al neutro (6.5). Sin embargo, debe considerarse que en el tracto intestinal de la larva existe una parte donde el pH es cercano a 2, lo que permitiría la absorción del compuesto, por lo

cual en condiciones naturales el pH es ácido, lo que favorece la disociación de la azida.

Raicu y Mixich (1992) al trabajar en valores neutros de pH también reportaron un efecto positivo en células humanas con azida de sodio 2%. La dependencia del efecto citotóxico de azida en un medio ácido puede explicarse también por el incremento en la permeabilidad de las células.

Otra alternativa para algunos resultados negativos de azida involucran la permeabilidad y transporte del metabolito (L-azidoalanina, AZAL) o el bloqueo del grupo lábil de derivados de AZAL.

Una posibilidad final es la destrucción preferente de uno de los dos enantiómeros de AZAL dentro de las células. Puesto que el L-isómero se formaría *in vivo*, una hipótesis lógica sería la destrucción del D-isómero que normalmente no se encuentra.

Se sabe que la azida inhibe muchos procesos celulares que pueden ser responsables de la muerte de las células, aún cuando no se consideran como vías blanco para inducir mutaciones (James et al., 1980). Por ejemplo, la baja inducción de mutantes por azida, en comparación con la inducción por azida activada en cebada, al tratar cepas de *Sacharomices cerevisiae* podría tener diferentes explicaciones entre las cuales está la gran toxicidad del compuesto que ocasionaría muerte celular, o que la cantidad de azida activada que es suficiente para producir mutaciones detectables, sólo se puede alcanzar en dosis letales de NaN₃ (Veleminsky et al., 1979).

En este trabajo la disminución en la frecuencia de manchas, después de una respuesta positiva (en las concentraciones de 0.63 mM y 0.75mM) en la cepa de alta bioactivación, para manchas grandes y totales puede deberse a la inhibición de las enzimas involucradas en la biotransformación o a la mayor capacidad de desintoxicación de la cepa.

Con estos resultados es factible concluir que la azida de sodio es un mutágeno de acción directa en *D. melanogaster*.

Reparación

Es importante considerar el papel que juegan las enzimas involucradas en el proceso de reparación en la aparente falta de mutagenicidad en algunos organismos.

Los experimentos en *S. typhimurium* sugieren que la lesión inicial de azida provoca una distorsión en la hélice del ADN reconocible por endonucleasas de reparación por escisión (Kleinhofs y Smith, 1976).

Al parecer todo el daño puede ser rápida y eficazmente reparado por medio del mecanismo de reparación por escisión porque en ausencia de este tipo de reparación el daño puede fijarse como un evento mutacional.

Algunos experimentos implican una reacción entre el ADN y la azida. Una reacción similar se describió entre una azida fotosensible derivada de bromuro de etidio y ADN. Los datos indican que los mecanismos de mutagénesis de azida en mamíferos pueden ser de un modo indirecto, posiblemente a través de la inhibición de la síntesis de ADN o de los sistemas de reparación (Arenaz et al., 1983).

En *S. typhimurium* azida indujo revertantes his⁺ en derivados deficientes en el sistema de reparación por escisión, por lo que se concluyó que este sistema debía de ser importante en la mutagénesis de azida (Kleinhofs y Smith, 1976).

El que la azida sea un potente mutágeno en cebada quizás puede deberse a la ausencia de reparación por escisión. Trabajos recientes mostraron la existencia de reparación por escisión en cebada, pero no se conocen estudios que midan directamente la capacidad de las células de cebada de escindir dímeros de pirimidina. Esta falta de escisión de dímeros se ha reportado en células de *Nicotiana*, *Haplopappus*, *Ginkgo* y *Chlamydomonas*. Sin embargo, si existe reparación por escisión en embriones de chícharo no comestible (*Lathyrus sativa*) y en protoplastos de zanahorias silvestres. Quizá durante la evolución algunas especies de plantas han perdido la capacidad de llevar a cabo en forma eficiente la

reparación por escisión, y estas especies son las que muestran alta mutagenicidad por azida (Kleinhofs y Smith, 1976).

Kleinhofs y Smith (1976) sugirieron que la falta de mutagenicidad en ratas puede ser debida a un eficiente sistema de reparación por escisión.

Si la reparación estuviera implicada en la respuesta mutagénica de azida esperaríamos que el agente se comportara de la misma forma en las dos cruzas, puesto que ambas presentan los mismos sistemas de reparación.

El daño genético que provoca la pérdida de bases puede ofrecer un buen sustrato para una vía de reparación sujeta a error y rompimiento de la hebra. En el ADN de cebada dañado por agentes alquilantes se demostraron vías de reparación por escisión y reparación post-replicación (Veleminsky et al., 1977).

Las primeras investigaciones acerca de la mutagenicidad de azida indicaban que un sistema de reparación sujeto a error podría ser un proceso post-replicación similar al que repara el daño inducido por UV. Por lo que la recombinación (necesaria en la reparación post-replicación) estaría involucrada en la reparación de las lesiones inducidas por la azida de sodio y que este sistema de reparación está sujeta a error. En otras palabras, las lesiones inducidas por azida y las inducidas por UV en el ADN se repararían por el mismo sistema.

En este trabajo se observó un incremento significativo en la inducción de manchas gemelas lo que indicó la presencia del mecanismo de recombinación, ya que este tipo de manchas son el resultado de la recombinación entre flr^3 y el centrómero; por lo que estos datos apoyarían la hipótesis anterior.

En *S. typhimurium* la azida es mutagénica al inducir sustitución de pares de base que no se incrementaron al utilizar el plásmido pKM 101 (factor R) el cual, amplifica la actividad de mutágenos que se relacionan con reparación por recombinación sujeta a error (De Flora et al., 1978). A partir de los resultados se concluyó que las lesiones no se repararon por un proceso post-

replicativo, y que quizás las lesiones inducidas por azida provocaron mutaciones que se repararon por un mecanismo adicional libre de error (Tomlinson, 1980).

Metabolismo

En este trabajo, en la cepa de alta bioactivación el metabolismo diferencial disminuyó la actividad mutagénica y recombinogénica de azida de sodio, los resultados negativos pueden deberse a varias razones.

Los sistemas de desintoxicación podrían explicar la falta de mutagenicidad en *Drosophila*, quizás el metabolito que se forma *in vivo* se destruye rápidamente antes de que pueda funcionar como mutágeno (Rosichan *et al.*, 1983). Y probablemente el metabolismo incrementado da lugar a una mayor desactivación y excreción del compuesto mutagénico, lo cual concuerda con lo que se observó en la cepa metabólica. También podría deberse a la unión de azida con las hemoproteínas, que son más abundantes en la cepa metabólica (Arenaz y Nilan, 1981)

Otro factor importante es la vida media o duración del metabolito, es probable que éste se destruya rápidamente antes de poder inducir daño, aunque Owais *et al.*, (1981a) reportaron que es muy estable.

De acuerdo con Arenaz y colaboradores (1983) el metabolito observado puede no ser la última especie mutagénica, ya que algunos datos apoyan la hipótesis de que azidoalanina requiere de posterior bioactivación.

En la tabla IV puede observarse que para las dos cruces (estándar y metabólica) hubo un incremento significativo en la inducción de manchas grandes. Graf y colaboradores (1984) sugirieron que el tamaño de mancha, en cierta manera, podría indicar si un compuesto es o no directo. Un agente indirecto requeriría de mayor tiempo para metabolizarse antes de producir el daño por lo que se formarían principalmente manchas chicas; en

cambio un compuesto que no necesite bioactivarse produciría manchas grandes, principalmente, ya que afectaría a un clon celular en las primeras divisiones, por lo que los resultados obtenidos apoyan la idea de que azida de sodio actúa de forma directa.

Un reporte que apoya esta hipótesis es el de Owais (1993) donde se muestra que el metabolito, L- azidoalanina, no interactúa con el DNA in vitro, aún cuando utilizó cepas deficientes en reparación por escisión.

La azida de sodio es una de las pocas sustancias sin actividad carcinogénica que es mutagénica en la prueba de Ames, y que no necesitó de activación por la fracción S9 (Jones et al., 1980; Arenaz et al., 1983).

Los resultados negativos encontrados en *N. crassa* podrían deberse a que este eucarionte no posee el metabolismo para convertir la azida a un metabolito mutagénico (AZAL) (Tomlinson, 1980).

Al principio se creyó que el metabolito mutagénico de azida se formaba a través de enzimas de activación contenidas en la fracción microsomal S9. Sin embargo con la fracción microsomal de mamíferos, azida redujo su actividad mutagénica, esta disminución en la mutagenicidad puede deberse a la unión de este compuesto a las proteínas microsomales (De Flora et al., 1979).

La mutagenicidad de azida disminuyó repentinamente después de la preincubación del compuesto con jugo gástrico de humano. Los resultados indicaron que el efecto se debía exclusivamente a la fuerte reacción ácida de este fluido biológico, en este ambiente, la azida está presente, principalmente, en forma de ácido hidrazoico (De Flora et al., 1979).

También se ha reportado que en un medio ácido este compuesto actúa como un poderoso inhibidor de oxidoreductasas (Slamenova y Gabelova, 1980). Aunque al parecer el proceso de desactivación no se efectúa por medio de reacciones de óxido-reducción.

Estos efectos metabólicos pueden ayudar a interpretar el aparente desacuerdo entre los resultados de los ensayos de mutagenicidad y carcinogenicidad con este compuesto.

Otros experimentos muestran que la mutagenicidad de azida puede ser disminuida por la presencia de fracciones post-mitocondriales dependientes del sistema de generación NADPH (De Flora et al., 1979).

Tentativamente los mecanismos involucrados en la desactivación de azida recuerdan a los que se llevan a cabo por azoreductasas microsomales, las cuales tienen un requerimiento específico por NADPH. Aunque se reportó que las azoreductasas sólo desactivan compuestos azoaromáticos, existe la posibilidad de que estas enzimas puedan también ser activas en otros sustratos. Sin embargo, la disminución de la mutagenicidad con fracciones post-mitocondriales de hígado no se incrementó por la riboflavina, la cual aumenta la actividad de la azoreductasa en la fracción S9 (De Flora et al., 1979).

La formación del metabolito mutagénico y la mutagenicidad de azida son inhibidas por la presencia de altos niveles de L-cisteína. Este aminoácido no inhibe la mutagenicidad del metabolito en las mismas concentraciones en que inhibe completamente la mutagénesis de la azida (Owais et al., 1981a).

La inhibición de la mutagénesis de azida por la L-cisteína en *S. typhimurium* puede deberse a la inhibición de la síntesis o degradación del metabolito, o a la reacción de la L-cisteína con un precursor del metabolito mutagénico para producir una forma inactiva.

La imposibilidad para abolir la mutagenicidad del metabolito con L-cisteína excluye la posible reacción de L-cisteína con el metabolito o la inducción de enzimas catabólicas que degradan el metabolito. Sin embargo, los resultados no excluyen la posible reacción *in vivo* entre la L-cisteína y azida o con el precursor del metabolito (Owais et al., 1981a).

Se ha observado que la o-acetil-L-serina se requiere en la síntesis del metabolito de azida o su precursor (Arenaz et al., 1983). Quizás la enzima o-acetil-L-serina puede revertir la acción de la L-cisteína mediante la inhibición de la síntesis del metabolito. Esto puede deberse a la función de la o-acetil-L-serina

como un intermediario en la biosíntesis del metabolito mutagénico (Owais et al., 1981a). Ciesla y Fiutowicz (1979) indicaron que la o-acetil-L-serina es esencial para la acción mutagénica de azida.

Puesto que las teorías de permeabilidad, transporte, y degradación del metabolito parecen inadecuadas para explicar las diferencias en la respuesta mutagénica, queda la posibilidad de que AZAL deba ser bioactivado posteriormente, probablemente por enzimas asociadas con el metabolismo de los aminoácidos. El procesamiento enzimático explicaría fácilmente los aparentes requerimientos para los grupos amino y carboxilo observados en mezclas racémicas de azida. Debido a la activación de AZAL podría esperarse que se catalizara por enzima(s) que normalmente usan aminoácido(s) como sustrato (La Velle y Mangold, 1987).

La débil respuesta genotóxica de las células de mamífero a azida de sodio puede ser debida a varias razones. Una de éstas es la incapacidad de las células para convertirla a su intermedio mutagénico, sin embargo éstas parecen ser capaces de convertirla con una eficiencia reducida. Estos datos son similares a los reportados por Rosichan y colaboradores (1983) con especies que parecen ser resistentes a la mutagénesis de azida a pesar de poseer la actividad de la enzima o-acetilserina sulfidrilasa. Sus datos incluyen especies inferiores de eucariontes y plantas que señalan un posible mecanismo común involucrado en la resistencia (o susceptibilidad) a la genotoxicidad de azida, por lo que la falta de mutagenicidad en estos organismos está relacionada con su capacidad de reparar el ADN.

Las células de mamífero pueden ser capaces de transformar azida a su intermediario y las evidencias experimentales sugieren que la aparente falta de mutagenicidad de azida no se debe al secuestro de azida por un componente del medio (Sander, 1978).

Otra posibilidad es que la azida también puede ser desintoxicada por las células de mamífero y producirse un intermediario no mutagénico (Arenaz et al., 1983). Aunque las células de mamífero poseen las enzimas necesarias para convertir a la azida al metabolito, parecen incapaces de producir grandes

cantidades del intermediario mutagénico. Otros datos apoyan la hipótesis de que azida puede ser modificada posteriormente en las células de mamífero a un intermediario que no es genotóxico.

La falta de efecto en la inducción de ICH puede ser por la desactivación de azida o a la incapacidad de los linfocitos para metabolizarla. De hecho, la evidencia preliminar sugiere que el metabolito de *Salmonella* no produce ICH en linfocitos (Arenaz y Nilan, 1981).

Drosophila melanogaster

En la prueba de letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster* no hubo un incremento significativo en la frecuencia de mutación después de la inyección abdominal de machos con soluciones amortiguadoras con pHs de 3.8 y 4.6. Sin embargo en moscas alimentadas por 3 días con 0.1 mM de azida en un pH de 4.6 se observó un débil efecto positivo. El resultado negativo probablemente se debió a la falta de metabolismo para activar el compuesto ya que la ruta de administración no dió oportunidad para que esto se llevara a cabo, pues como lo señalan Kamra y Gollapudi (1979) la ruta por la cual algunos mutágenos son administrados puede alterar marcadamente sus efectos mutagénicos en *Drosophila*.

Por otra parte, esta variación en la respuesta mutagénica podría reflejar la diferencia en la cantidad del compuesto que alcanzó las gonadas, por diferencias en la ingestión y exposición, ya que el tratamiento oral fue de tres días y la concentración fue mas alta cuando se alimentaron.

Se pensaba que la falta de mutagenicidad en *Arabidopsis*, *Neurospora* y *Drosophila* podría deberse a la falta de actividad de la enzima o-acetilserina sulfidrilasa o a la presencia de antimetabolitos. Sin embargo algunos estudios demostraron la capacidad de estos organismos para producir un metabolito mutagénico en *S. typhimurium* y revelaron que en los extractos de estas especies existían niveles significativos de actividad de o-acetilserina sulfidrilasa (Rosichan et al., 1983).

En células humanas HEP-2 al utilizar vesículas MLV y SUV la azida provocó aberraciones cromosómicas y cromatídicas. Puesto que la substancia no se diluyó en el medio de cultivo, sino que se dirige a las células, se producen daños genéticos mayores, el pH empleado fue 7.2. La frecuencia de aberraciones fue significativamente más alta en azida encapsulada que en azida disuelta en el buffer (González et al., 1991).

Los datos confirman que azida de sodio es un mutágeno de acción directa, sin embargo se requieren más estudios para entender su(s) mecanismo(s) de acción.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los experimentos indican que:

- 1.- Al emplear la cepa estándar en el sistema de prueba SMART en las alas de *Drosophila melanogaster* se detectó la actividad mutagénica y recombinogénica inducida por la azida de sodio.
- 2.- En la crusa de alta bioactivación, probablemente la azida de sodio o el metabolito sean desactivados y/o excretados con mayor eficiencia, por lo que no se detectó ninguna actividad mutagénica.
- 3.- La respuesta positiva en la cepa estándar y negativa en la cepa con alta bioactivación, sugiere que la azida de sodio es un mutágeno de acción directa.

B I B L I O G R A F I A

Arenaz, P., R.A. Nilan (1981) Effect of sodium azide on sister-chromatid exchanges in human lymphocytes and chinese hamster cells. *Mutation Res.* 88: 217-221

Arenaz, P., R.A. Nilan, A. Kleinhofs (1983) Lack of induction of single-strand breaks in mammalian cells by sodium azide and its proximal mutagen. *Mutation Res.* 116: 423-429

Beyer, H. (1987) *Manual de química orgánica*. Ed. Reverté S.A. España. 287-288 pp

Cassaret, L.J. (1975) *Toxicology of the poisons. The basic science*. Macmillan Publishing Co., Inc. New York, USA

Ciesla, Z., Piutowicz, M. (1979) Azide mutagenesis in gram-negative bacteria reversion of the mutagenic effect by L-cystine. *Mutation Res.* 66: 301-305

Conger, B.V., J.V. Carabia (1977) Mutagenic effectiveness and efficiency of sodium azide versus ethyl methane sulfonate in maize: induction of somatic mutations at the *yg2* locus by treatment of seeds differing in metabolic state and cell population. *Mutation Res.* 46: 285-296

Cotton, F.A., R.N. Wilkinson (1988) *Química inorgánica avanzada*. Ed. Limusa México. 513-514 pp

De Flora, S., R. Coppola, P. Zanicchi, C. Bennecelli (1979) Reversal of sodium-azide mutagenicity by liver preparations and by gastric juice. *Mutation Res.* 61: 387-392

Delgado, R.A. (1990) Daño genético inducido por mutágenos positivos en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de

licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM 75 pp

Frei, H., F.E. Würzler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Res.* 203: 297-308

Frölich, A., F.E. Würzler (1991) The "High Bioactivation" cross for the SMART assay with the wing. *DIS 70 Technique Notes* 246-247

García-Bellido, A. y J. Dapena (1974) Induction, deletion and characterization of cell differentiation mutant in *Drosophila*. *Molec. Genet.* 128:117-130

García-Bellido, A., J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Development Biology* 24: 61-87

Gardner, E.J. (1988) *Principios de genética*. Ed. Limusa. México. 551 pp

Gichner T., J. Veleminsky (1988) Inhibitors of N-nitroso compounds-induced mutagenicity. *Mutation Res.* 195:21-43

González, F.J., C.L. Crespi, H.V. Gelboin (1991) cDNA-expressed human cytochrome P450s: a new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutation Res.* 247: 113-127

Gordon, S.M., J. Drachman, L.A. Bland, M.H. Reid, M. Favero, W.R. Jarvis (1990) Epidemic hypotension in a dialysis center caused by sodium azide. *Kidney International* Vol 37: 110-115

Graf, U., F.E. Würzler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in

Drosophila melanogaster. Environmental Mut. 6: 153-188

Graf, U., N. van Schaik and R. Pacella. Improved "High Bioactivation" cross for the SMART wing assay. DIS 70(July 1991) 247-248

Graf, U., N Van Schaik (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 271: 59-67

Hällstrom, I., A. Blanck, S. Atuma (1984) Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. Chemical Pharmacology Vol 33 No1 13-20 pp

Hernández, A.J. (1993) Relaciones estructura química-actividad genotóxica de 7 compuestos en células somáticas de los ojos de *Drosophila melanogaster* utilizando cepas con y sin actividad metabólica incrementada. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM 68 pp

Index Merck (1989) Encyclopedia of chemical and drugs. Published by Merck and Co. 1606 pp.

James, J.A., J.R. Starkey, A. Kleinhofs (1980) Toxicity and mutagenicity of sodium azide in mammalian cell cultures. Mutation Res. 77: 239-299

Kamra, O.P., B. Gollapudi (1979) Mutagenic effects of sodium azide in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 66: 381-384

Kleinhofs, A., J. A. Smith (1976) Effect of excision repair on azide-induced mutagenesis. Mutation Res. 41: 233-240

Kleinhofs, A., M. Kleinschmidt, D. Sciak, S. von Broembsen (1975) Azide mutagenesis. In vitro studies. Mutation Res. 29: 497-

Kleinhofs, A., W.M. Owais, R.A. Nilan (1978) Azide. Mutation Res. 55: 165-195

La Velle, J.M., J.B. Mangold (1987) Structure-activity relationships of the azide metabolite, azidoalanine, in *Salmonella typhimurium*. Mutation Res. 177: 27-33

Lindsley, D.L., E.H. Grell (1968) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution, Publ. Washington D.C. 627 pp

Lindsley D.L. y G.G. Zimm (1985) The genome of *Drosophila melanogaster*. Part I: genes a-k. DIS 62, 121.

Lippmann, Ph. D. (1992) Environmental Toxicants Human Exposures and their Health Effects. Van Nostrand Reinhold. New York. 699 pp.

Nilan, R. A., E.G. Sideris, A. Kleinhofs, C. Sander, C. F. Konzak (1973) Azide- a potent mutagen. Mutation Res. 17: 142-144

Nöthinger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. DIS 45: 177.

Obe, G.A.T. Natarajan (1982) Mechanisms of the origin of structural chromosomal aberrations, En: D. Müller, A.T. Natarajan, G. Obe, G. Rohrborn (Ed). Sister chromatid exchange test. Thiensstratton Inc. New York. pp 1-5.

Organización Mundial de la salud (1980) Criterios de salud ambiental 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. México. 287 pp.

Owais, W.M. (1993) The lack of L-azidoalanine interaction with DNA. In vitro studies. Mutation Res. 302: 147-151

Owais, W. M., M.A. Zarowitz, R.A. Gunovich, A.L. Hodgdon, A. Kleinhofs, R.A. Nilan (1978) A mutagenic in vivo metabolite of sodium azide. Mutation Res. 53: 355-358

Owais, W.M., A. Kleinhofs, R.A. Nilan (1981a) Effects of L-cysteine and O-acetyl-L-serine in the synthesis and mutagenicity of azide metabolite. Mutation Res. 80: 99-104

Owais, W. M., A. Kleinhofs, R.C. Ronald, R.A. Nilan (1981b) Isolation of an azide mutagenic metabolite in *Salmonella typhimurium*. Mutation Res. 91: 155-161

Raicu, P., F. Mixich (1992) Cytogenetic effects of sodium azide encapsulated in liposomes on heteroploid cell cultures. Mutation Res. 283: 215-219

Ramos M.,P., H.M. Abundis, J.C. Gaytán, M.G. Ordaz, P.G. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E. M. Galicia, J. A. Muñoz (1993) Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill. México. 131 pp.

Rosichan, J.L., W.M. Owais, A. Kleinhofs, R.A. Nilan (1983) In vitro production of azide mutagenic metabolite in *Arabidopsis*, *Drosophila* and *Neurospora*. Mutation Res. 119: 281-285

Sander, C., R.A. Nilan, A. Kleinhofs, B.K. Vig (1978) Mutagenic and chromosome-breaking effects of azide in barley and human leukocytes. Mutation Res. 50: 67-75

Slamenova, D., A. Gabelova (1980) The effects of sodium azide on mammalian cells cultivated in vitro. Mutation Res. 71: 253-261

Timbrell, J.A. (1989) Introduction to toxicology. Taylor & Francis Ltd. USA. 156 pp.

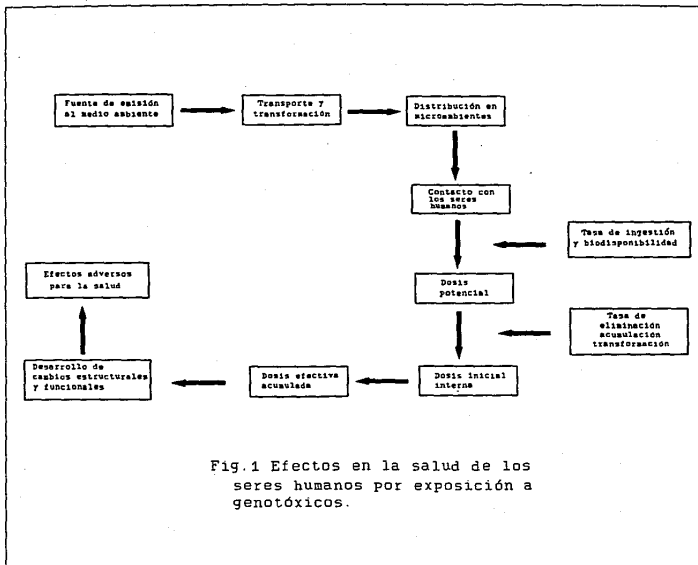
Tomlinson, C.R. (1980) Effects of pH on the mutagenicity of sodium azide in *Neurospora crassa* and *Salmonella typhimurium*. Mutation Research 70: 179-191

Velemínský, J., T. Gichner, V. Pokorný (1977) Induction of DNA single-strand breaks in barley by sodium azide applied at pH 3. Mutation Res. 42: 665-670

Velemínský, J., L. Silhánková, V. Smiovská, T. Gichner (1979) Mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* by sodium azide activated in barley. Mutation Res. 61: 197-205

Vogel, E.W., (1991) Genotoxic chemicals an introduction into basic principles of genetic toxicology. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, R.U. Leiden Sylvius Laboratoria. 66 pp

Zijlstra, J.A., E.W. Vogel (1988) Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazines, hidrazines and seniciphylline in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 202: 251-267



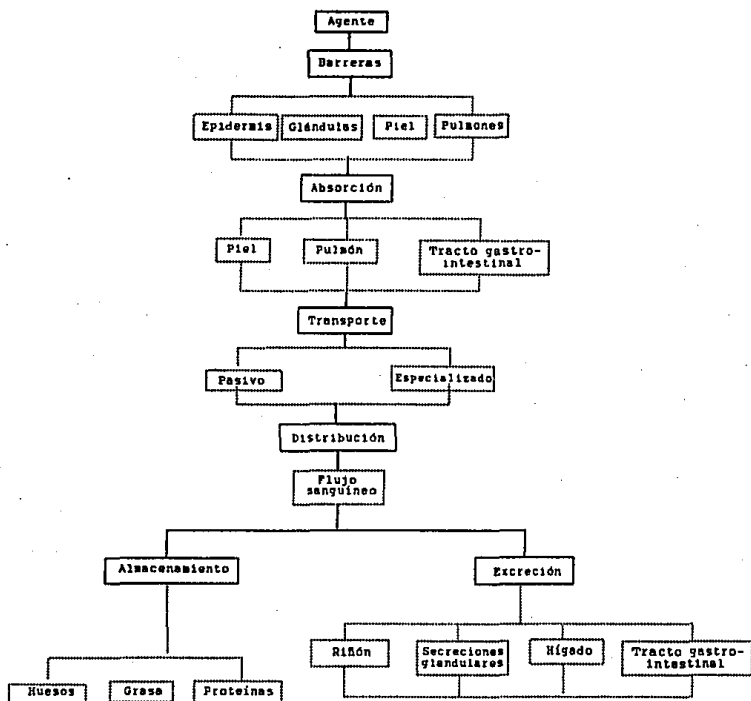


Fig. 2 Rutas de absorción, transporte, distribución, almacenamiento y excreción de agentes tóxicos en el cuerpo (Cassarett, 1975).

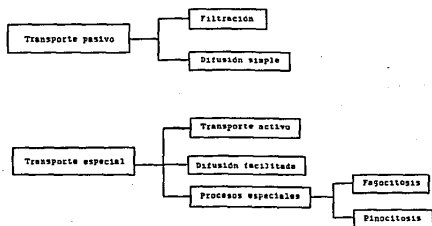


Fig. 3 Mecanismos de transporte por los cuales un compuesto atraviesa las membranas del cuerpo (Vogel, 1991).

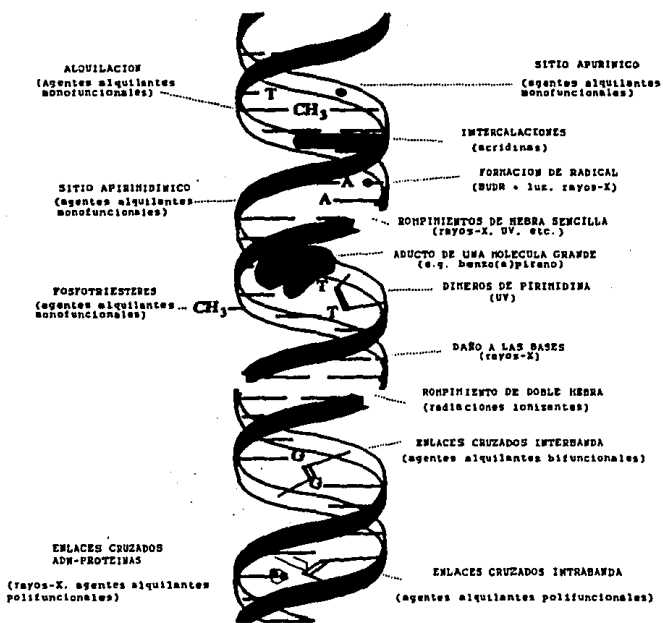


Fig. 4. Sitios de posibles mutaciones en la molécula del ADN (Obe y Natarajan, 1984).

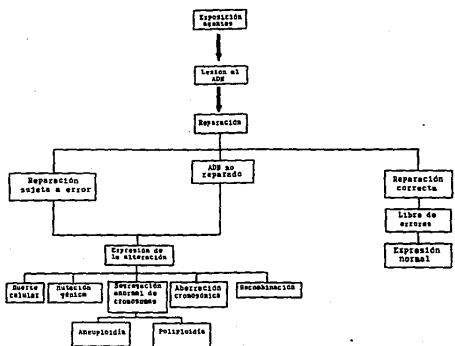


Fig. 5 Efectos de los mutágenos sobre el ADN de las células, con o sin reparación.

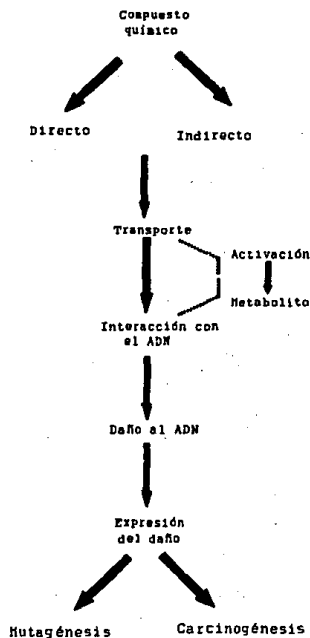


Fig.6 Principales etapas en la inducción de daño al ADN por mutágenos y carcinógenos.

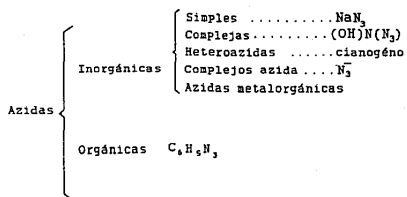


Fig.7 Clasificación de las azidas de acuerdo con Kleinhofs et al., 1978.

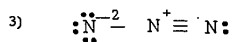
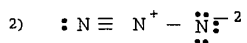
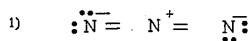
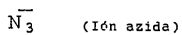
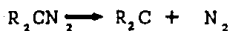
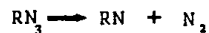
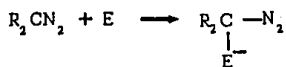
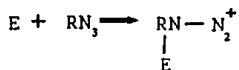


Fig.8 Estructura o resonancia iónica del grupo azida (Kleinhofs et al. . 1978).

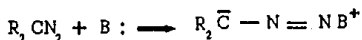
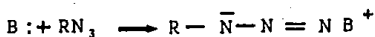
a) Unión del grupo azida al nitrógeno o especies electron-deficientes.



b) Reacción con un átomo electrofílico



c) Reacción con un átomo nucleofílico



d) Reacción con radicales libres

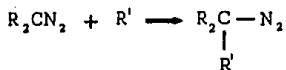


Fig. 9 Reacciones que pueden ocurrir con el grupo azida (Kleinhofs et al., 1978)

Ensayos de mutación bacteriana	{	<i>Salmonella typhimurium</i>
Ensayos de genotoxicidad en eucariontes inferiores	{	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces pombe</i> <i>Neurospora crassa</i>
Síntesis no programada de ADN en células de mamífero	{	Fibroblastos Células HeLa
Citogenética <i>in vitro</i> e Intercambio de cromátidas hermanas	{	Células de criceto (CHO) Fibroblastos de criceto
Citogenética <i>in vivo</i>	{	Análisis de metafases de médula ósea de ratón Prueba de micronúcleos
Plantas superiores	{	<i>Tredecantia</i> <i>Vicia faba</i>
Eucariontes (Otros)	{	<i>Drosophila melanogaster</i> Letales dominantes en ratón

Fig. 10 Principales sistemas de prueba empleados en protocolos de mutagénesis.

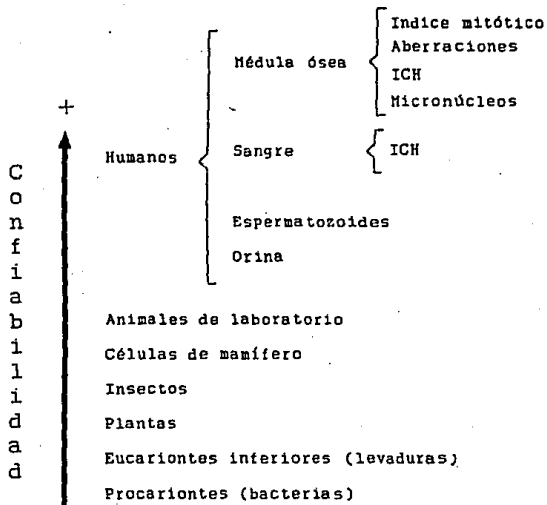


Fig. 11 Confiabilidad aproximada de los diferentes sistemas de prueba.

I. OXIDACIONES

a) Oxidaciones microsómicas

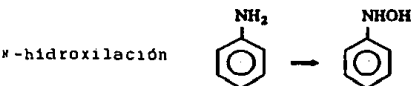
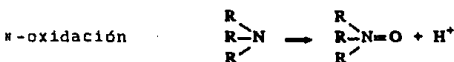
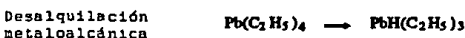
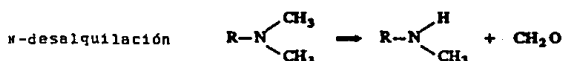
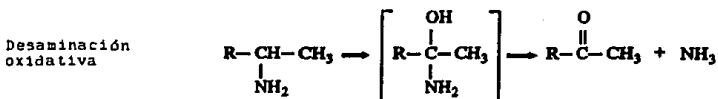
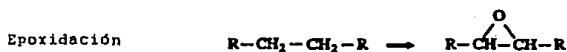
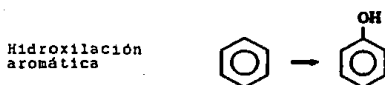
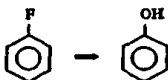


Fig. 12 Principales reacciones para metabolizar xenobióticos en los organismos (OMS, 1980).

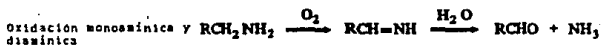
Desulfuración



Deshalogenación



b) Oxidaciones no microsómicas



Deshidrogenación de alcohol



Deshidrogenación de aldehído



II. REDUCCIONES

a) Reducciones microsómicas



Deshalogenación reductiva



b) Reducciones no microsómicas

Reducción de aldehído



III. HIDROLISIS

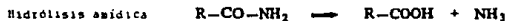
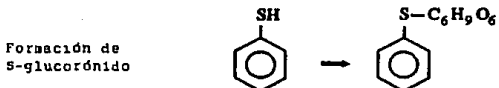
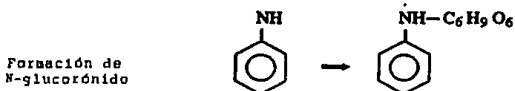
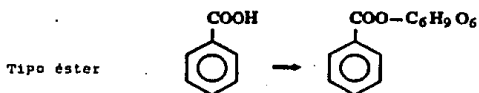
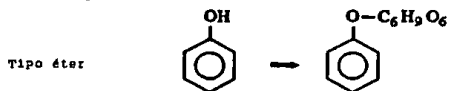


Fig. 12 Continuación

IV. CONJUGACION

a) Conjugaciones mediadas por el ácido difosfoglucorónico uridina (UDPGA)

Formación de O-glucoronido



b) Conjugaciones mediadas por 5-fosfosulfato de 3-fosfoadenosina (PAPS).

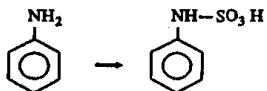
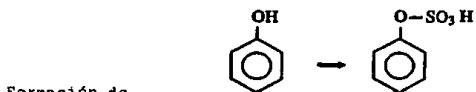
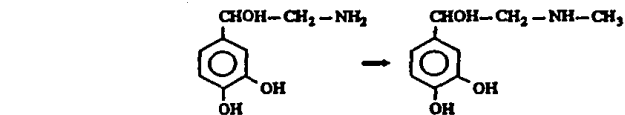
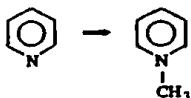


Fig. 12 Continuación

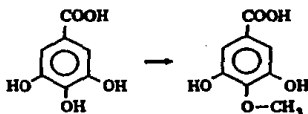
c) Metilaciones



n-metilación



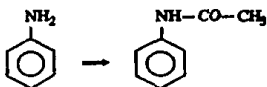
s-metilación



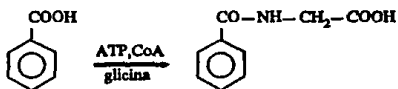
o-metilación



d) Acetilaciones



e) Conjugaciones peptídicas



f) Conjugaciones con glutation

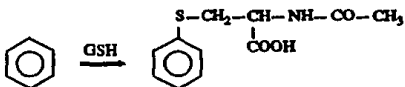


Fig. 12 Continuación

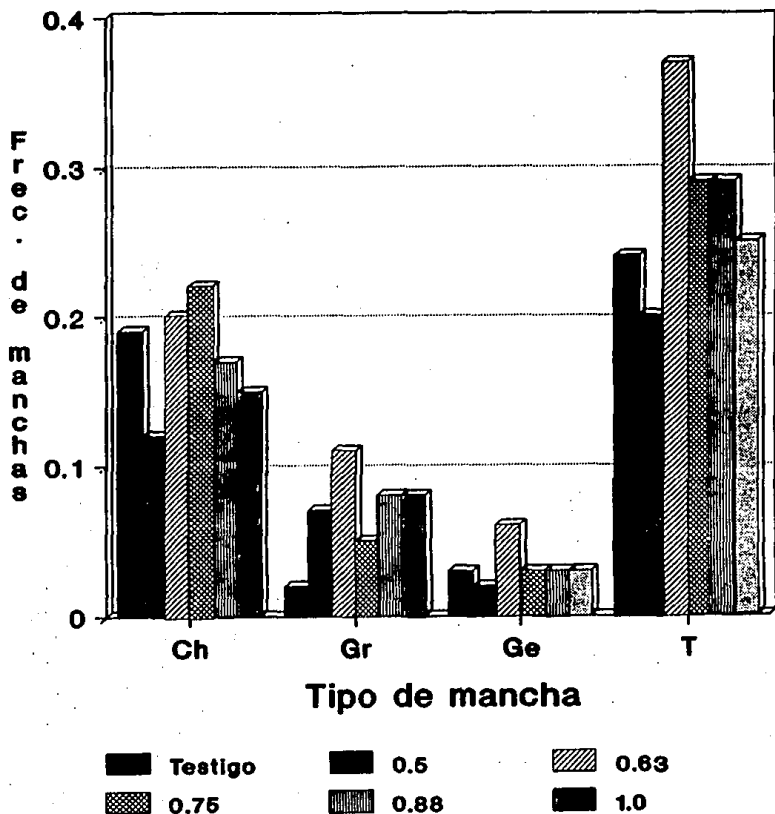


Fig. 13. Frecuencia de manchas inducidas por azida de sodio en cepas estándar de *Drosophila*.

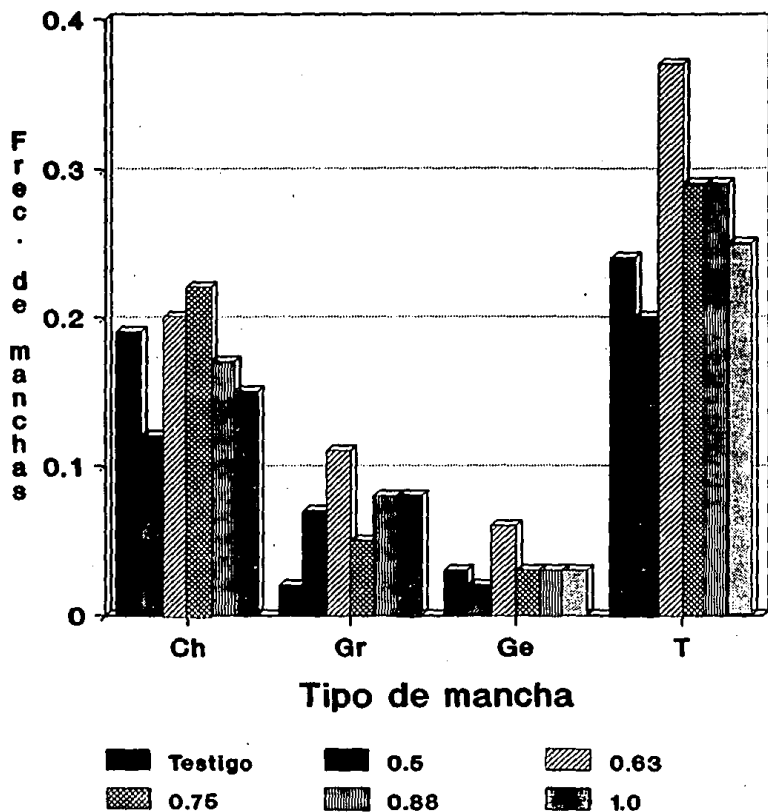


Fig. 14. Frecuencia de manchas Inducidas por azida de sodio en cepas con alta bioactivación de *Drosophila*.

Tabla I. Efectos de la azida de sodio sobre algunas enzimas (Kleinhofs *et.al.*, 1978).

Enzima	Conc. (mM)	pH	Efecto
Uricasa	5.0	6.8	Inhibida 40%
	5.0	7.8	Inhibida 28%
Aminoxidasa	10.0	—	Inhibida 8%
Anhidrasa carbónica	3.0	7.0	Inhibida 85%
	3.0	8.0	Inhibida 40%
Aldehído oxidasa	1.0	6.0	Inhibida 80%
	0.5	6.0	Inhibida 45%
Mieloperoxidasa	1.0	—	Inhibida totalmente
Fosforibuloquinasa	1.0	—	No inhibida
Superóxido-dismutasa	1.0	—	No inhibida
Carboxi-peptidasa	—	—	No inhibida

Tabla II. Resumen de los resultados obtenidos en pruebas de mutagénesis con tratamientos de azida de sodio.

Organismo	pH	Prueba/Evento terminal	Conc. (mM)	Diag.	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Entrecruzamiento	1.0	-	Kleinhofs et al., 1975
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Resistentes a penicilina y estreptomicina		+	Nilan et al., 1973
<i>Salmonella typhisurium</i>	3	Cepa TA 1530	1.0	+	Kleinhofs y Smith, 1976
	3	Revertantes his+ (uvr)		+	Kleinhofs y Smith, 1976
	5-8	Pretratamiento con S-9 y jugo gástrico	100 microgr/ placa	-	De Flora et al., 1979
<i>Neurospora crassa</i>	3-8	Región ad-3	3.5	-	Tomlinson, 1980
Cebada	3	Rompimientos cromatídicos	1.0	+	Veleminsky et al., 1979
	3-7	Replicación	1.0	+	Sander et al., 1978
Maíz	3	Locus yg 2	1.0	-	Conger y Carabia, 1977
<i>Drosophila melanogaster</i>	3-4	SLRLT	5-0.1	-	Kanra y Gollapudi, 1979
	-	SHART	7-14.7	+	Delgado, 1990
Criceto chino	7.1	Células V79	-	+	Jones et al., 1980
	7.1	Células V7979	-	+	Jones et al., 1980
Linfocitos	7.1	ICH	5 - 50	+	Arenaz y Nilan, 1981

Tabla III. Efectos antimutagénicos de la azida de sodio sobre compuestos N-nitrosos observados en diferentes sistemas (Gichner y Veleminsky, 1988).

Organismo	Tratamiento	pH	Efecto
<i>E. coli</i>	No indicado	-	Evita la inhibición de la síntesis de ADN y su degradación producida por N-metil-N-nitrosourea (MNU) y N-metil-N-nitrosouretano (MNUA)
Cebada	Postratamiento (3 hrs)	7.0	Reduce la frecuencia de mutaciones inducidas por N-metil-N-nitrosourea (MNU)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Simultáneo	7.0	Reduce la frecuencia de mutaciones inducidas por N-etil-N-nitrosourea (ENU) y N-metil-N-nitrosourea (MNU)
<i>Vicia faba</i>	Pretratamiento	7.0	Reduce el efecto clastogénico provocado por N-metil-N-nitrosourea (MNU), N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), y N-nitrosometil-fenilamina (NHFA)

Tabla IV. Frecuencia de manchas inducidas por azida de sodio en dos cepas de *Drosophila melanogaster* (estándar y metabólica).

Conc. (mM)	Hdm. de alas	Manchas				Divisiones Celulares Promedio	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chica n=2	Simples grandes n=5	Gemelas n=5	Totales n=2		
Cepa estándar							
Testigo	118	0.16 (19)	0.03 (3)	0.02 (2)	0.020 (24)	1.87	0.8
0.50	120	0.24 (29) ¹	0.12 (14) ⁺	0.04 (5) ¹	0.40 (48) ⁺	2.38	1.6
0.63	120	0.24 (29) ¹	0.18 (22) ⁺	0.05 (6) ¹	0.47 (57) ⁺	2.89	1.9
0.75	120	0.28 (34) ⁺	0.26 (31) ⁺	0.17 (20) ⁺	0.71 (85) ⁺	3.07	2.8
0.88	120	0.36 (43) ⁺	0.23 (28) ⁺	0.25 (30) ⁺	0.84 (101) ⁺	3.07	3.3
1.00	116	0.28 (32) ⁺	0.39 (45) ⁺	0.22 (26) ⁺	0.89 (103) ⁺	3.59	3.5
Cepa metabólica							
Testigo	118	0.19 (22)	0.02 (2)	0.03 (4)	0.24 (28)	1.79	1.0
0.50	118	0.12 (14) ⁻	0.07 (8) ¹	0.02 (2) ⁻	0.20 (24) ⁻	2.77	0.8
0.63	120	0.20 (24) ⁻	0.11 (13) ⁺	0.06 (7) ¹	0.37 (44) ⁺	2.64	1.4
0.75	116	0.22 (25) ⁻	0.05 (6) ¹	0.03 (3) ⁻	0.29 (34) ⁻	2.12	1.1
0.88	120	0.17 (21) ⁻	0.08 (10) ⁺	0.03 (4) ⁻	0.29 (35) ⁻	3.18	1.1
1.00	118	0.15 (18) ⁻	0.08 (9) ⁺	0.03 (3) ⁻	0.25 (30) ⁻	2.61	1.0

Análisis estadístico realizado con el programa SMART (Wurgler no publicado): +. positivo; 1. indeterminado; P<0.05.