



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento de organismos sensibles y  
resistentes a xenobióticos en cepas de  
*Drosophila melanogaster***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A**

**BIOL. MA. DE JESÚS ISLAS GUZMÁN**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES**

**MÉXICO, D. F.,**

**SEPTIEMBRE, 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México; y apoyada parcialmente por el Proyecto PAPIIME: EN206803, DGAPA.**

Miembros del Comité Tutorial:

Dra. Patricia Ramos Morales  
Dr. José Miguel Betancourt Rule  
Dr. Emilio Rojas del Castillo

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a la memoria de mi sobrina *Karen Griselida* con todo mi cariño y amor y doy gracias a la vida por haberme permitido tener su ternura y amor durante casi 15 años. Gracias *Princesa*, te amo.

A mi madre la Señora *Cecilia Guzmán Pérez* por ser en cada momento de la vida un ejemplo de fortaleza, optimismo y amor, por mostrarme los valores de la vida. Gracias *ma* por darle sentido a mi vida.

A mis diez hermanos por su gran cariño y apoyo. A *Soní, Carmen, Silvia, Víctor, Marío, Luís y Oscar* (son gemelos), *Alvaro y César*.

A *Casí*, por mantener unida a la familia.

A mis tremendos sobrinos: *Omar, Laura, Brenda, Bruno y Luísito*, por su gran cariño y alegría.

A mi mejor amiga: "*Pituka*" por su gran cariño, por su incomparable amistad incondicional, gracias *Pitu*, por enseñarme a ver la vida de otra manera, nos volveremos a ver.

A *Pedro Luís* por su cariño y amistad, por ser especial en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Toda mi admiración y sincero agradecimiento a la Dra. Patricia Ramos Morales quien me inició en el estudio de la Genética y a quien debo este logro. Gracias Paty por compartir tus conocimientos, porque escuchar tus cátedras es escuchar verdaderos poemas que motivan el interés a seguir creciendo, pero sobretodo por tu gran calidad humana y tu paciencia, gracias por tu apoyo.

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo por sus atenciones y comentarios durante la realización de este trabajo, por sus finas atenciones.

Al Dr. Miguel Betancourt Rule por sus cuidadosos comentarios durante la realización de este trabajo y su atención.

A los sinodales:

Dra. Sandra Luz Gómez arroyo

Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón

Por su atención, disposición y valiosos comentarios.

A Pepe, por su apoyo en el trabajo de cómputo

A mis compañeros:

Adriana, por tu ejemplo de superación; Hugo Rivas, por tu apoyo incondicional y compañerismo; Blanca, por tu amistad; Armando, por tu compañerismo; Omar, por tu gran entusiasmo ¡Gracias!

A la gran familia del laboratorio de Genética (son muchos, más de 25) por su alegría y amistad. ¡Gracias chicos!

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
Resistencia .....	5
Selección .....	8
Tipos de selección .....	8
<i>Drosophila melanogaster</i> .....	10
Desarrollo de los discos imagales de <i>D. melanogaster</i> .....	13
Prueba de Mutación y Recombinación Somática .....	14
Metabolismo .....	18
Azida de sodio .....	20
Efecto de la azida en las enzimas .....	22
Mutagénesis .....	23
Antimutagénesis .....	27
<b>HIPOTESIS</b> .....	30
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
Líneas de <i>D. melanogaster</i> .....	31
Ensayo somático .....	32
Pruebas preliminares con azida de sodio .....	33
Cruzas experimentales .....	36
Sincronización de cultivos y obtención de larvas .....	36
Tratamientos .....	37
Procesamiento del material .....	39
Análisis de resultados .....	39
<b>RESULTADOS</b> .....	41
<b>DISCUSIÓN</b> .....	63
<b>CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>REFERENCIAS</b> .....	73

## RESUMEN

La adaptación de los organismos a su ambiente es el resultado de la diversificación en la capacidad para transformar moléculas complejas en otras más simples que pueden ser utilizadas o eliminadas de forma más eficiente. La exposición a sustancias extrañas al metabolismo, implica un reto importante en el que la dotación genética y la intensidad de la exposición son factores cruciales. En insectos, el estudio de la resistencia a algunos insecticidas ha servido para comprender algunas estrategias involucradas en la respuesta de toxicidad. La resistencia es la capacidad que presentan algunos organismos para sobrevivir a niveles de concentración que resultan letales para la fracción susceptible de una población expuesta. Se han identificado numerosas enzimas que participan en la respuesta hacia compuestos tóxicos y la actividad de algunas ha sido relacionada con la exposición a compuestos particulares.

La Azida de Sodio ( $\text{NaN}_3$ ), es ampliamente utilizada en la industria química para estabilizar reacciones de síntesis de diversos compuestos. Es una sustancia que reacciona con especies reactivas de oxígeno, específicamente se le ha clasificado como un atrapador de oxígeno singulete. Existe controversia en el diagnóstico de la capacidad mutagénica de la  $\text{NaN}_3$  o más propiamente del metabolito azidoalanina el cual es producido por la O-acetil serina sulfidrilasa (OASS) ya que aunque induce rompimientos de cromosomas en sistemas vegetales y es un potente mutágeno para sistemas bacterianos (+S9), su actividad genotóxica en cultivos animales es ambigua. Aunque en *Drosophila melanogaster* se ha detectado la presencia de la OASS, el tratamiento con  $\text{NaN}_3$  resulta en una débil inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo; pero en células somáticas de las alas induce manchas mutantes por actividad recombinogénica ( $p < 0.05$ ). En este organismo también ha sido evidente que existe heterogeneidad en la respuesta a la exposición a  $\text{NaN}_3$ , especialmente a concentraciones altas. La tolerancia a altas concentraciones de  $\text{NaN}_3$  podría

estar asociada a incapacidad para producir al metabolito reactivo o a una mayor capacidad de desintoxicación.

El objetivo de esta tesis fue aislar organismos resistentes a la  $\text{NaN}_3$  en cepas de *Drosophila melanogaster* y comparar el índice de sobrevivencia de moscas seleccionadas y no seleccionadas. Como objetivos particulares se planteó comprobar si la selección modifica la respuesta de genotoxicidad inducida por la  $\text{NaN}_3$  y por el promutágeno N-nitrosodimetilamina (NDMA) mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART)

En la primera parte del trabajo se realizó la selección de dos cepas que se utilizan para la evaluación de mutación y recombinación somática en células de las alas de *Drosophila* (cepas *flr* y *mwh*). Los organismos se cultivaron en presencia de  $\text{NaN}_3$  [0.001 mM, concentración inicial]. La selección progresiva se realizó incrementando la concentración de  $\text{NaN}_3$  azida en el medio de cultivo. Actualmente los cultivos de las dos cepas (*flr* y *mwh*) se mantienen a una concentración de 0.1 mM para la generación  $F_{161}$ . De forma paralela se mantuvieron por separado a las dos cepas (*flr* y *mwh*) en medio sin azida como cepas testigo. En una segunda etapa, se comparó el efecto de la exposición subcrónica a la  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM] o a agua destilada en organismos seleccionados (s) y no seleccionados (ns) utilizando cuatro tipos de cruzas (el primer término corresponde a las hembras): a) ns x ns, b) s x ns, c) ns x s y d) s x s. No se observaron diferencias entre la progenie recobrada de los lotes testigo pero la frecuencia de mutación y recombinación somática se incrementó, en el siguiente orden: ns x s > ns x ns = s x s > s x ns. La respuesta más homogénea se recobró en la crusa s x s. En la  $F_{47}$  se realizó la misma prueba pero ahora utilizando NDMA [10 mM]. Nuevamente las moscas de la crusa s x s mostraron una respuesta más homogénea. La inducción de mutación y recombinación somática en las cuatro cruzas fue: sx ns > ns x ns = s x s > ns x s. Esta estrategia se repitió en la  $F_{87}$ , pero utilizando una concentración menor de la NDMA [5 mM] para confirmar si las diferencias entre las cruzas se mantenían. La



frecuencia de mutación y recombinación somáticas siguió el orden: ns x s > ns x ns = s x ns = s x s. En el tratamiento con NDMA en la F<sub>47</sub>, el número de manchas por mosca fue similar en las cuatro cruzas pero en la F<sub>87</sub>, el número de manchas por mosca fue menor y más homogéneo en la progenie de la craza s x s. En ambos tratamientos, el tamaño de las manchas mutantes fue menor en las moscas de la craza s x s. Si bien los tratamientos con NaN<sub>3</sub> y NDMA se realizaron en generaciones diferentes, los resultados obtenidos apoyan la propuesta de que la resistencia a la NaN<sub>3</sub> tiene una base genética. Esta resistencia se manifiesta además en una capacidad metabólica diferencial hacia el promutágeno NDMA. Se requiere avanzar en la determinación de los niveles constitutivos e inducibles de las principales enzimas que participan en la respuesta a la acción de genotóxicos. Por otra parte, es necesario determinar la actividad de la O-acetil serina sulfidrilasa en las moscas seleccionadas. De esta manera se avanzará en la comprensión del mecanismo de acción de la NaN<sub>3</sub> como mutágeno o veneno metabólico.

## INTRODUCCIÓN

La adaptación de los organismos a su ambiente es el resultado, entre otros factores, de la diversificación en la capacidad para transformar moléculas complejas en otras más simples, ya sea para utilizarlas como fuente de energía o para evitar efectos de toxicidad para el organismo. En mamíferos, la biotransformación o cambio en la estructura química de un compuesto ocurre en tejidos y órganos especializados como el intestino, pulmones, riñones, piel e hígado; en insectos, los cuerpos grasos tienen también participación importante en la formación de moléculas más simples (Klaassen, 1975; Goodman, 1990) (Fig. 1). En términos generales, el proceso de biotransformación de xenobióticos incluye dos fases denominadas I y II. En la I, reacciones como oxidación, reducción e hidrólisis modifican a las moléculas catalizando la formación de grupos reactivos como OH, NH<sub>2</sub>, COOH o SH en ellas. Por otra parte, las reacciones de la II forman conjugados entre el agente químico ambiental y sustancias endógenas como glicina, cisteína, glutatión (GSH), ácido glucorónico, sulfatos y otros compuestos solubles en agua. Con frecuencia, los xenobióticos sufren de manera sucesiva reacciones de fase I y II, aunque algunos sólo son modificados por reacciones de una fase. Por ejemplo, un compuesto extraño lipofílico será oxidado de manera que un grupo funcional (hidroxilo) es formado en la molécula, posteriormente este grupo funcional es acoplado por las enzimas de conjugación a una molécula polar facilitando su excreción (Cuadro 1) (Bac, 1971; Timbrell, 1989; Manahan, 1991; Feyereisen, 1993; Saner *et al.*, 1996; Le Goff *et al.*, 2006).

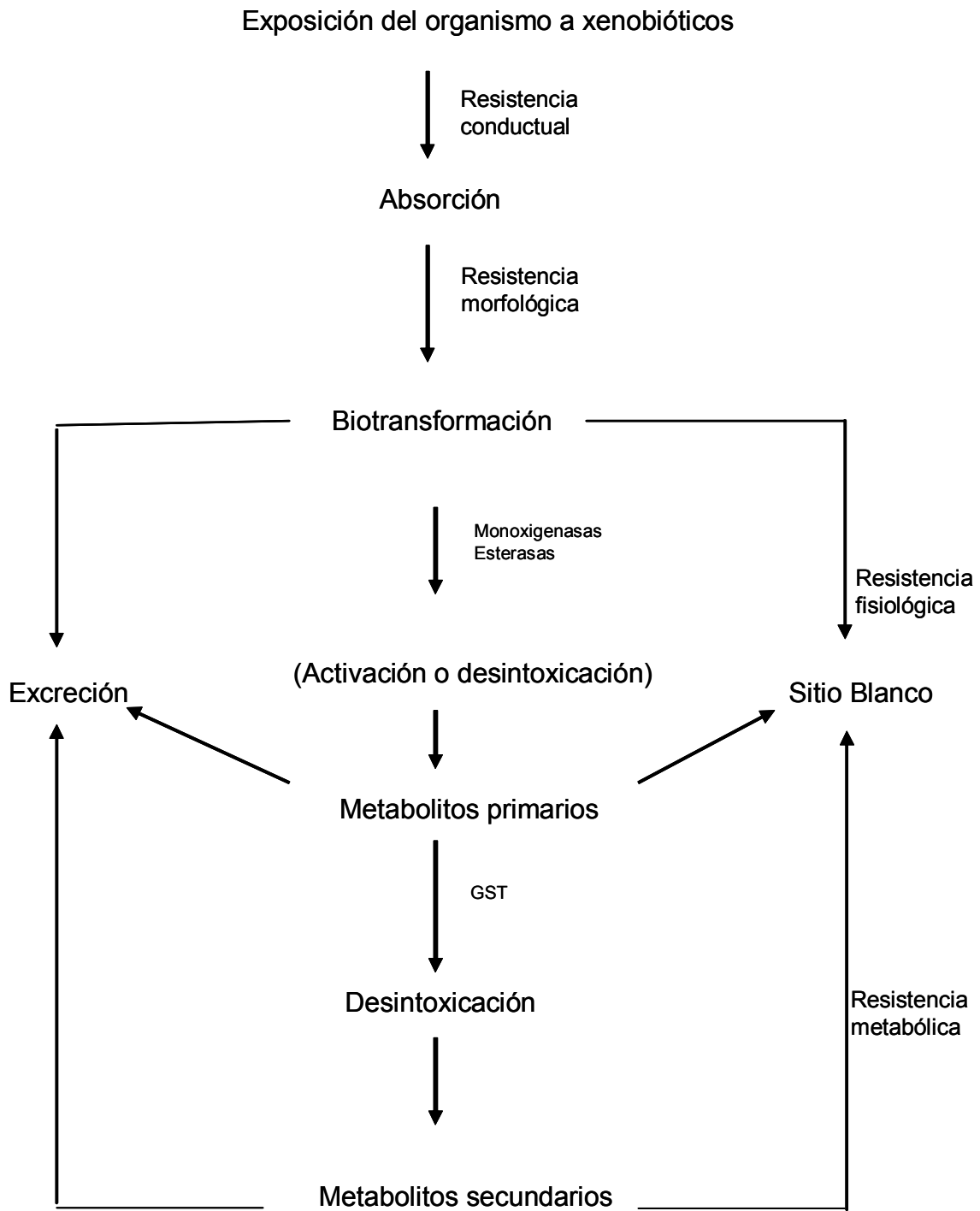


Fig. 1 Mecanismos de desintoxicación de agentes xenobióticos (Vermeulen, 1996)

Cuadro 1 Principales reacciones de biotransformación de algunos xenobióticos en las diferentes fases del metabolismo (Chang *et al.*, 1996)

Reacción	Enzima	Sustrato
Fase I		
Oxidación	Oxidasa de función mixta	Alcanos, alquenos, arenos, aminas
Oxidación	Alcohol deshidrogenasas	Alcoholes
Reducción	Oxidasa de función mixta	Grupos azo y nitro
Hidrólisis	Esterasas	Ésteres
Fase II- Conjuación con:		
Agua	Epóxico-hidrolasa	Epóxidos
Glutación	Glutation-transferasas	Electrofilicos
Ácido glucurónico	Glucoronil-transferasas	Fenoles, tioles, aminas
Ácido acético (Acetil-CoA)	N-acetiltransferasas	Aminas

Generalmente, los niveles constitutivos de estas vías metabólicas son suficientes para eliminar pequeñas cantidades de toxinas naturales y sintéticas relacionadas con el ambiente en el que se desarrolla el organismo, pero pueden ser insuficientes para enfrentar cambios drásticos en los niveles alcanzados, constituyendo un riesgo para los seres vivos incluyendo a los seres humanos al

provocar efectos adversos (Cassaret, 1975; Albert, 1988; Scott, 2001; Wilson, 2001).

Los cambios drásticos en las condiciones ambientales o la introducción de sustancias extrañas (xenobióticos) producen efectos evaluables; por ejemplo, del tipo de interacción que se establezca entre el xenobiótico y el ambiente dependerá la cantidad o la dosis de éste disponible para la biota. En otro enfoque, el sitio de acción del xenobiótico, con las proteínas y el material genético, mostrará cambios que desencadenarán efectos en niveles superiores de la organización biológica. Así, la exposición de los organismos a sustancias extrañas a su metabolismo implica un reto importante en el que la dotación genética de éstos y la intensidad de la exposición son factores cruciales (Zijlstra, 1984, 1987; Lippmann, 1992; Scott, 1995; Peña *et al*, 2001).

Los componentes de cada uno de los principales sistemas enzimáticos: monooxigenasas dependientes de Citocromo P450, esterases no específicas y glutatión S-transferasas (GST) pueden sufrir diversos eventos mutagénicos, los cuales resultan en alteraciones en la capacidad para desintoxicar xenobióticos. Muchas poblaciones de insectos muestran una marcada habilidad metabólica debida a la sobreexpresión alcanzada por aumento en la tasa de transcripción de genes que confieren al organismo mayor capacidad de desintoxicación (Cuadro 2). Este incremento es comúnmente alcanzado por la sobreexpresión transcripcional de genes CYP450 y por otras enzimas como GST o por amplificación de genes de enzimas hidrofílicas (Undseth *et al.*, 1990; Devonshire y Field 1991; Capdevila *et al.*, 1995; Feyereisen, 1999; Dunkov *et al.*, 1996; Feyereisen, 1993, 1999; Bolt *et al.*, 2003; Caro y Cederbaum, 2005; Le Goff *et al.*, 2006).

Las GST juegan un papel central en la desintoxicación de compuestos endógenos y xenobióticos, además participan en el transporte intracelular, biosíntesis de hormonas y protección contra estrés oxidante. El interés en las GSTs de insectos está enfocado principalmente a la resistencia a insecticidas, aunque al igual que en la enzimas dependientes de P450 ocurre la resistencia cruzada hacia varios sustratos. La conjugación neutraliza el sitio electrofílico del sustrato lipofílico y protege a los componentes celulares. Por otra parte, la conjugación produce derivados más solubles facilitando su excreción de la célula (González *et al.*, 1993; Helvig *et al.*, 2004; Enayati *et al.*, 2005; Siddique *et al.*, 2005; Le Goff *et al.*, 2006).

## **Resistencia**

La resistencia se define como la capacidad de un organismo para sobrevivir a la exposición a toxinas (sean naturales, como los alcaloides o sintéticos, como los pesticidas) en niveles mucho mayores que aquellos que resultan letales para los organismos susceptibles (Scott, 1995; Bourguet *et al.*, 1996; Feyereisen, 1999; Wilson, 2001; Cakir y Sarikaya, 2005). La susceptibilidad individual es de suma importancia en la respuesta de genotoxicidad ya que puede reducir o acentuar el impacto de un agente potencialmente dañino a los organismos dependiendo de la carga genética de éstos. Así, en las poblaciones algunos individuos mostrarán mayor capacidad para desintoxicar o activar compuestos, pero también se encontrarán otros que muestren una actividad menor al valor característico de la especie (Fig. 2). Si bien la mayor capacidad para desintoxicar podría significar que el tiempo de permanencia de un genotóxico es menor en estos organismos, también podría derivar en un aumento en la disponibilidad del compuesto reactivo.

Cuadro 2. Mutaciones genéticas asociadas a tipos de resistencia (Enayati *et al.*, 2005)

Tipo de resistencia	Amplificación génica	Expresión alterada	Cambio estructural
<b>Metabólica</b> P450 oxidasas Esterasas GSTs	ND + ND	+ ND +	ND +
<b>Insensibilidad a sitio blanco</b> Acetilcolinesterasa GABA receptor Canal de sodio JH receptor	ND ND ND ND	ND ND ? ?	+ + ? ?
<b>Otros</b> Penetración reducida Cambios conductuales	- -	- -	- -

ND no detectado; + confirmado o fuertemente indicado; ? implicado pero no confirmado; - datos no disponibles.

Aún otros determinantes propios de cada organismo podrían modular el impacto de posibles genotóxicos, como son los genéticos: especie, sexo o fisiológicos: edad, estado nutricional, hormonal y salud (Ramos-Morales y Rodríguez-Arnaíz, 1994; Brusick, 1975; Feyereisen, 1999; Peña *et al.*, 2001).

Dinámicamente, la composición de una población constituida por organismos susceptibles y resistentes expuesta a un factor de selección, por ejemplo, la presencia de un genotóxico por un periodo prolongado se modifica gradualmente, al favorecer la reproducción de los organismos que son capaces de sobrevivir a la

exposición. La respuesta puede ser temporal, cuando resulta de la inducción de una o varias enzimas que degradan toxinas sólo cuando el organismo es expuesto; este efecto no se considera heredable, ya que al eliminarse el factor de selección los organismos portadores de genes asociados con la susceptibilidad pueden sobrevivir y reproducirse nuevamente. Por otra parte, la tolerancia puede también ser heredable debido a cambios en un gen que confiere resistencia, estos cambios persisten aún después de que se ha eliminado al estímulo tóxico (Mackenzie, 1993, 1994, 1996; Scott, 1995; Wilson, 2001; Herrero *et al.*, 2001).

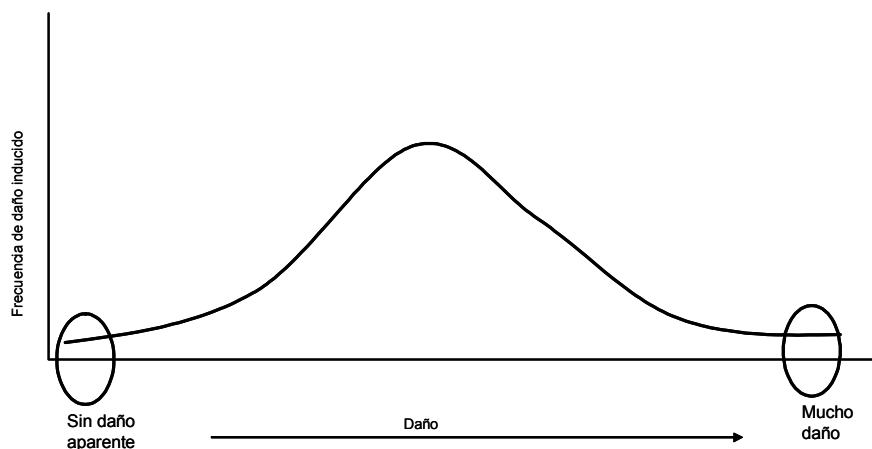


Figura 2. Distribución de la respuesta genotóxica ante la exposición a agentes xenobióticos

Para establecer si la resistencia a algún xenobiótico tiene bases hereditarias, es decir, si ésta se debe a un gen, a variantes alélicas presentes en la población, o a varios genes se han utilizado diversas estrategias, entre éstas, la selección de organismos sometidos a un factor de selección, como la presencia de un xenobiótico (French-Constant, *et al.*, 1994, 1999; Berrada y Fournier, 1997; Wilson, 2001).

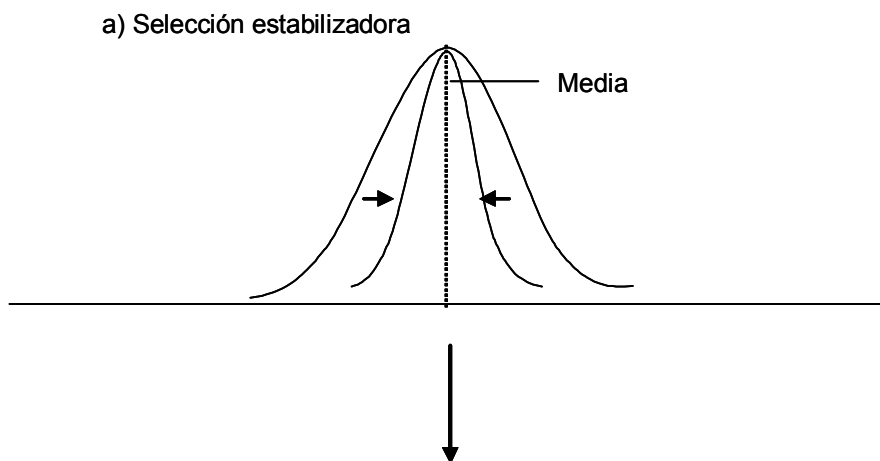


## Selección

La selección, natural o artificial, es un proceso por el que algunos fenotipos y por ende algunos genotipos, dejan más descendientes que otros (adecuación  $>1$ ). En el campo de la toxicología la selección artificial se ha enfocado al aislamiento de organismos por exposición a sustancias químicas a largo plazo (presión química). Los cambios heredables que se producen a través de las generaciones con relación al carácter seleccionado se observarán en la variabilidad genética de la población seleccionada (Berrigan *et al.*, 1997; Wilson, 2001).

### Tipos de selección

La variabilidad inherente a las poblaciones biológicas adquiere la forma de una distribución en forma de campana. La selección puede actuar de diferentes maneras en una población (Fig. 3). La selección estabilizadora opera eliminando continuamente individuos de ambos extremos de la distribución fenotípica (Fig. 3a). Este tipo de estrategia produce menos diversidad de genotipos y aumenta la



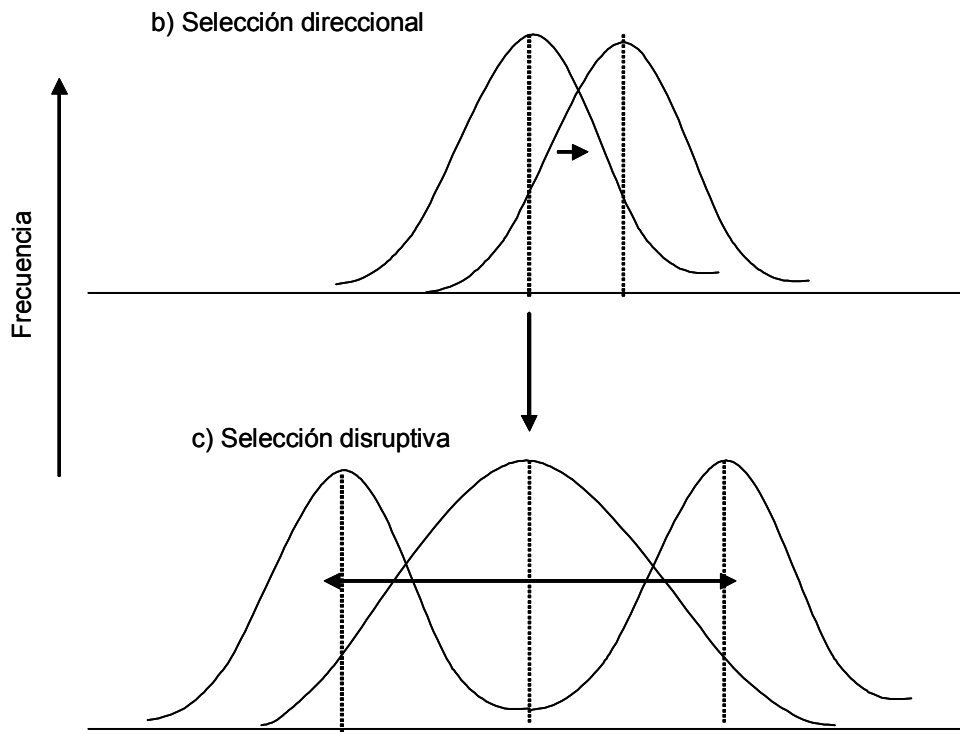


Fig. 3 Modelos que muestran la distribución de los organismos después del proceso de selección (Russell, 1998)

adecuación de la población. De esta forma, el valor promedio del carácter se mantiene sin cambio a lo largo del tiempo. La estrategia direccional elimina continuamente individuos de uno de los extremos de la distribución, es decir en dirección hacia su mayor adecuación. De esta forma el valor promedio del carácter es desplazado constantemente hacia uno de los extremos de la distribución fenotípica (Fig. 3b). La evolución de la resistencia a pesticidas o la resistencia a antibióticos en bacterias son ejemplos de este proceso. La tercera estrategia, es la selección disruptiva, que favorece a los individuos de ambos extremos de la

distribución fenotípica a expensas de los de fenotipo intermedio (Tamarin, 1982; Russell, 1998; Klug y Cummings, 1999) (Fig. 3c)

### ***Drosophila melanogaster* como sistema de prueba**

El sistema de *Drosophila* reúne las características de un organismo modelo en la biología experimental, debido a su número cromosómico pequeño ( $n = 4$ ), bajo costo de mantenimiento, corta duración en su ciclo de vida, producción de prole numerosa y porque ha mostrado capacidad de biotransformación similar a la de la fracción S9 del hígado de mamíferos, además de ser sumamente sensible a bajas concentraciones y de conocerse detalladamente su genoma (De Serres, 1979; Baars *et al.*, 1980; Zijlstra, 1984; Hällstrom *et al.*, 1982, 1984, 1985; Adams *et al.*, 2000; Maitra *et al.*, 2000; Herrera-Bazán, 2005).

Es un organismo holometábolo por lo que su desarrollo es completo y consta de los estadios: huevo, larva, pupa e imago (Demerec, 1965; Lewis, 2004) (Fig. 4).

La larva eclosiona a las 24 h del ciclo de vida y presenta dos linajes celulares diferentes; las células larvarias forman las estructuras de la larva mientras que las células imagales, darán origen a las estructuras del adulto en la metamorfosis. Una vez establecidas las células precursoras de los discos imagales, éstas siguen un desarrollo paralelo al larvario (Demerec, 1965). Las células larvarias llevan al cabo las funciones vitales de esta edad, han perdido su capacidad de división y solamente aumentan de tamaño, por presentar cromosomas politénicos que se forman mediante el fenómeno de endomitosis, son poliploides y están

determinadas y diferenciadas genéticamente (Demerec, 1965; Wilkins y Vogel, 1986; Pomerai, 1990).

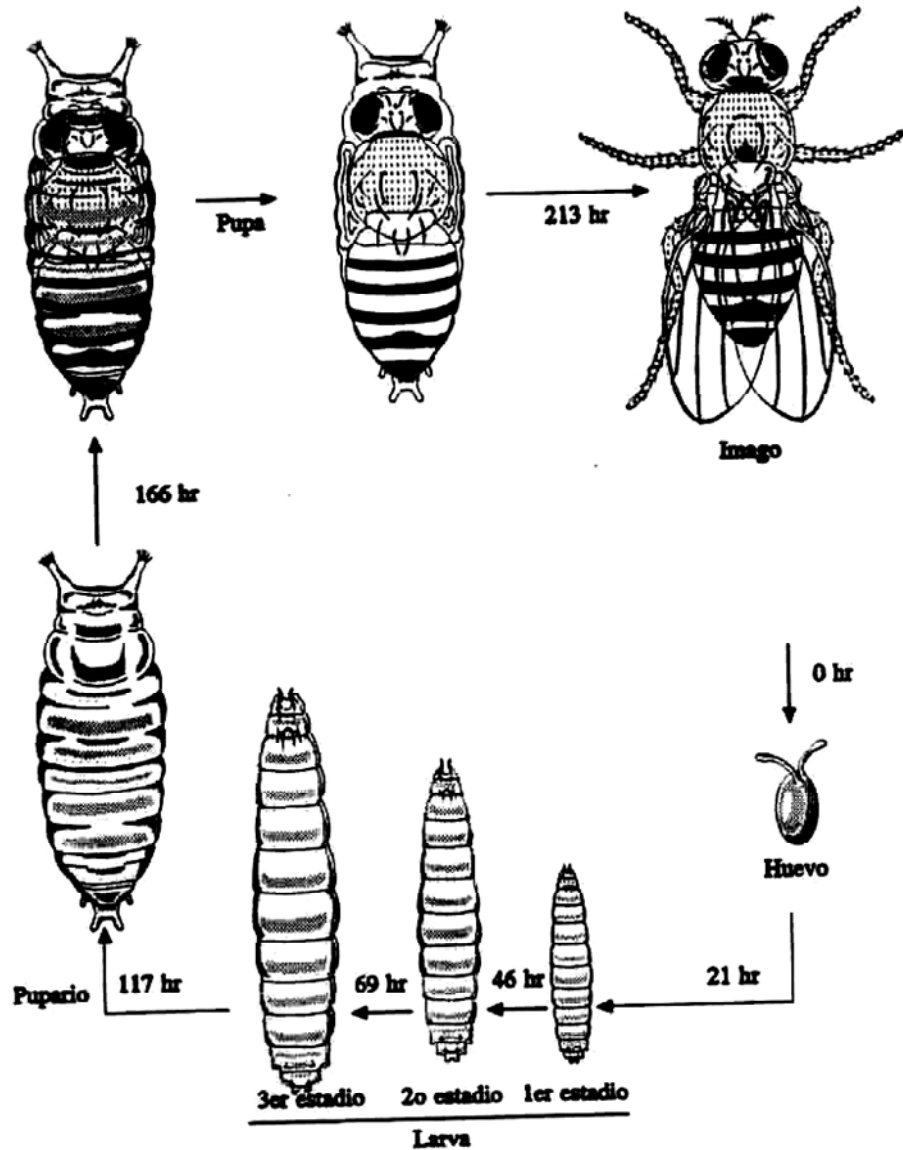


Fig. 4 Duración de los estadios durante el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, a 25° C y 65% de humedad relativa (Maldonado, 1994)

Las células precursoras de los discos imagales (no participan en funciones vitales para el estadio larvario), se originan del ectodermo poco después del estado de blastodermo celular, siendo evidentes al final de la embriogénesis en el estado 14

y 15. Las células imagales se multiplican mediante divisiones mitóticas que ocurren en momentos particulares durante el desarrollo larvario y empiezan a organizarse como sacos epiteliales con un lumen central. Se unen por un tallo a las estructuras larvarias y están inervadas al sistema nervioso central. Las células imagales son distinguibles de las larvales por su tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retención de la capacidad de división celular y porque están determinadas genéticamente alcanzando su diferenciación hasta que entran a la etapa de metamorfosis (Demerec, 1965; Pearson, 1974). Los histoblastos que forman la cubierta abdominal no se diferencian durante el desarrollo larvario; su diferenciación da inicio con divisiones celulares que ocurren alrededor de 3 horas antes de la pupación, doblando su número cada 3.6 horas, de manera que alrededor de 15 horas después de la pupación, las células empiezan a migrar, desplazando a las células epidérmicas larvarias las cuales son histolizadas (Roseland y Scheneiderman, 1979; Clark, 1985).

En la última muda larvaria, la cutícula se endurece de manera paulatina y se torna oscura, dando lugar al pupario. Durante la metamorfosis, que ocurre dentro del pupario, la hormona ecdisona, encontrada al final del tercer estadio larvario y en las prepupas desencadena una serie de cambios en el organismo, los cuales involucran la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto a partir de los discos imagales. Los órganos que son completamente histolizados durante la metamorfosis son: glándulas salivales, intestino, cuerpos grasos y músculos larvarios (Demerec, 1965; Ramos-Morales *et al*, 1993; Rodríguez-Arnaíz, 2003).

La mayor parte de los órganos del adulto se forman a partir de los discos imagales ya presentes en la larva y por células larvarias que se diferencian al ocurrir la reorganización del estado pupal; los tubos de Malpighi se alteran poco durante la metamorfosis aunque sí sufren algunos cambios en su composición estructural. El tórax se forma por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades locomotoras, los ojos, las antenas, las alas y el aparato genital se originan a partir de sus discos imagales respectivos, que sufren histogénesis durante el desarrollo pupal dando lugar a las distintas partes del cuerpo del adulto. El estadio pupal termina cuando emerge adulto (Demerec, 1965; Rodríguez-Arnaíz y Ramos-Morales, 1992).

### **Adulto**

El imago o adulto rompe el extremo anterior del pupario, por donde sale al exterior. Al principio, el cuerpo de la mosca es alargado, sin pigmentación, tiene las alas totalmente plegadas y al poco tiempo éstas se extienden. A medida que pasan las horas el adulto adquiere su color característico. Esta es la etapa reproductiva del ciclo de vida; el imago alcanza la madurez sexual a las 4 ó 5 horas de edad (Demerec, 1965; Wilkins y Vogel, 1986; Ramos-Morales, *et al.*, 1993).

### **Desarrollo de los discos imagales de las alas de *D. melanogaster***

Durante el primer estadio larvario, los discos imagales de las alas se observan como un pequeño paquete constituido por 15 a 30 células epidérmicas. Durante el curso del crecimiento larvario las células de los discos se dividen e incrementan su número de manera exponencial (alrededor de 15 a 16 veces) para dar un total de

casi 50,000 células al final del tercer estadio larvario. Veinticuatro horas después de la formación del pupario, cesa la división de las células de los discos y éstos adquieren la forma y tamaño característicos, siendo la de un balón aplanado y plegado (García-Bellido y Mirriam, 1971; Crick y Laurence, 1975). Posteriormente, parte de las células del disco darán origen al *notum* y a las alas del adulto. Durante la metamorfosis ocurren una serie de movimientos celulares que dan como resultado que la superficie interna del disco se evierte, quedando ahora como la superficie externa de la estructura correspondiente en el adulto.

Cuando el imago emerge del pupario presenta las alas plegadas, durante una hora aproximadamente, la mosca inyecta linfa a las alas, que consisten en una especie de sacos que se extienden de manera gradual hasta quedar turgentes, el contacto con el aire seca y endurece la superficie de las alas que posteriormente son vaciadas al excretar la mosca el exceso de linfa, entonces las alas de *Drosophila* se observan como una estructura epitelial ancha y plana constituida por dos monocapas celulares (dorsal y ventral) con desarrollo independiente. Cada ala está formada por 30,800 células hexagonales, cada una de las cuales da origen a un tricoma (García-Bellido y Merriam 1971; Crick y Laurence, 1975).

### **Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)**

Las células somáticas de *Drosophila* proveen una técnica que permite detectar la capacidad de los agentes genotóxicos químicos, físicos o biológicos para inducir mutación y recombinación a nivel somático (Graf *et al.*, 1983, Golic, 1991; Zordan *et al.*, 1991). Actualmente más de 400 compuestos de diferentes clases químicas han sido analizados con este ensayo.

Es una metodología *in vivo* que sólo en 10 días produce resultados (Fig. 5). La variable de respuesta consiste en la inducción de clones celulares que se observan como manchas mutantes en las alas de los adultos si se utilizan marcadores fenotípicos para los tricomas de las alas. Cada ala está constituida por dos monocapas celulares (dorsal y ventral) con desarrollo independiente y una dinámica de divisiones mitóticas básicamente exponencial (García-Bellido y Merriam 1971). Los tricomas son procesos cuticulares unicelulares y el tamaño mínimo de expresión es de una célula, de manera que las manchas grandes evidencian la proliferación celular que ocurre después de la inducción y reparación de la lesión (García-Bellido y Merriam, 1971a; Garcia-Bellido y Dapena 1974; Graf *et al.*, 1983; Vogel *et al.*, 1985; Würgler *et al.*, 1985; Clements *et al.*, 1988).

El ensayo SMART detecta eventos genéticos como mutaciones puntuales, pérdidas cromosómicas, recombinación mitótica y no disyunción (Fig. 6). Aquellos eventos provenientes de mutación puntual, pérdida parcial, no disyunción y recombinación (entre los marcadores utilizados *flr* y *mwh*), originarán una mancha simple en las que las células involucradas expresarán solo uno de los marcadores mutantes (*flr* o *mwh*). Mientras que los eventos de recombinación entre el marcador proximal *flr* y el centrómero, darán origen a manchas gemelas, en las que células de ambos fenotipos (*mwh* o *flr*) forman parte de una mancha. En este último caso el centrómero funciona como un tercer marcador. Por su origen, las manchas gemelas son indicadoras de recombinación, proporcionando una importante herramienta para detectar eventos recombinogénicos (Zimmering, 1976; Graf *et al.*, 1984; Hernández-Aranda, 1993; Ramos-Morales *et al.*, 1993).



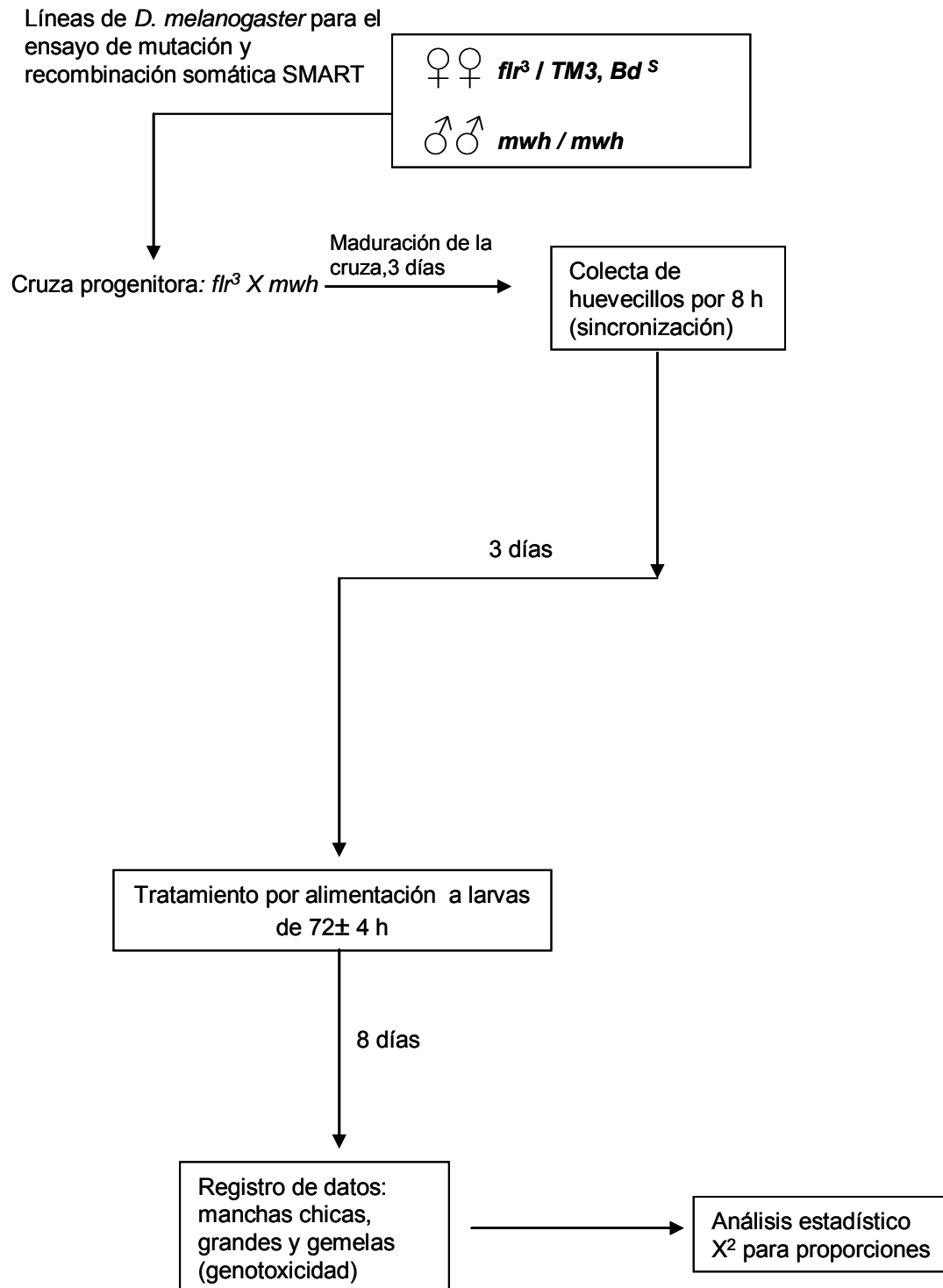


Fig. 5 Protocolo empleado para la prueba de mutación y recombinación somática (SMART).

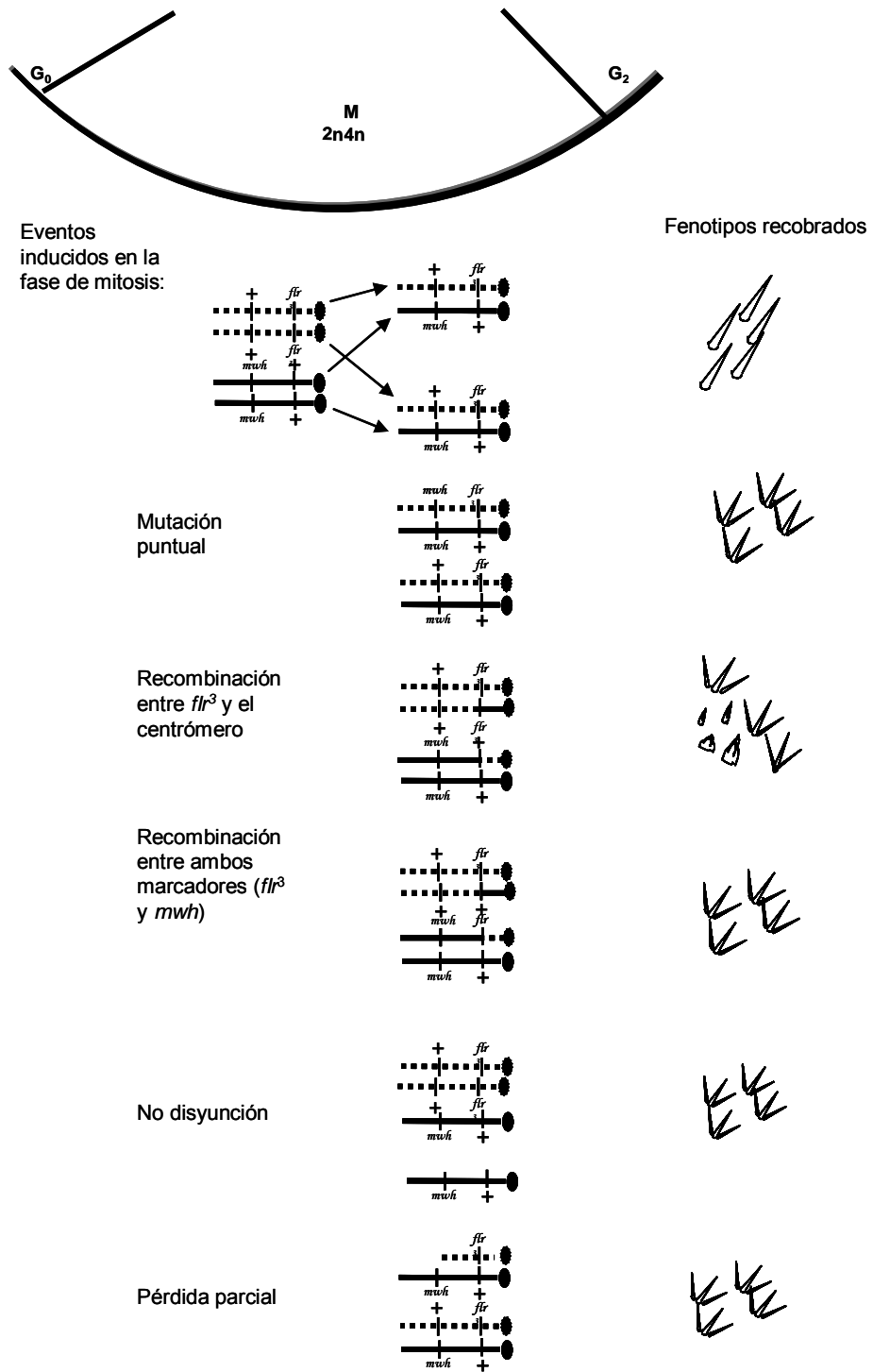


Fig. 6 Eventos genéticos que detecta la prueba de mutación y recombinación somáticas (Modificado de Graf *et al.*, 1984).

A través del tamaño de una mancha puede estimarse la cantidad de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en el linaje celular (clon) asumiendo que no se provoca retraso en la división celular ni muerte de las células implicadas (García-Bellido y Merriam, 1971; Graf *et al.*, 1984). De esta manera, la frecuencia de manchas por ala indica la cantidad de eventos genéticos (espontáneos e inducidos) y se relaciona con la genotoxicidad del compuesto; el tamaño promedio de las manchas estima el tiempo en el que fueron producidas y, por otro lado, las manchas pueden distribuirse de diferente manera entre organismos genéticamente similares, por lo que ante la misma exposición, algunas moscas mostrarán una alta densidad de manchas, mientras que en otras no se aprecian evidencias de efecto; la comparación de la distribución del número de manchas por mosca informa de la susceptibilidad de los organismos expuestos a un xenobiótico (García-Bellido y Dapena, 1974; Ramos-Morales *et al.*, 2003).

### **Metabolismo**

Las cepas de *Drosophila* con capacidad metabólica diferencial que han sido colectadas de zonas altamente contaminadas (zonas industriales o tratadas con plaguicidas), o las generadas en el laboratorio por presión química a largo plazo (exposición crónica) han mostrado ser resistentes a diversos compuestos, esta característica es referida como resistencia cruzada (Dapkus y Merrell, 1977; Zijlstra *et al.*, 1984, 1987; Scott, 1995; Feyereisen, 1999; Wilson, 2001). Con frecuencia, la resistencia es consecuencia de la sobreexpresión de los niveles constitutivos de las enzimas dependientes de P450, aunque otras enzimas como

las glutatión S-transferasas (GSTs) también pueden mostrar altos niveles constitutivos (Baars *et al.*, 1980; Hällstrom *et al.*, 1982; Zijlstra y Vogel, 1988; Lagadic *et al.*, 1993; Cariño *et al.*, 1994; Scott, 1998).

Las GST tienen amplia selectividad sin embargo, en ocasiones se sobreponen. La superfamilia de genes que codifican para las GST consta de muchos genotipos (polimorfismo). En el genoma de *Drosophila melanogaster* existen 42 genes que codifican para la GST, estas enzimas son tan complejas y versátiles como las P450. Algunos casos de resistencia se han atribuido al aumento en la cantidad de una o más enzimas GST, por amplificación génica, o más comúnmente, por incremento en la tasa transcripcional, más que por cambios cualitativos en las enzimas (Grant y Hammock, 1992).

En *Drosophila*, la resistencia vía P450 también puede ser debida a más de una mutación en un gen regulador P450. Las cepas de *Drosophila* resistentes a insecticidas presentan elevados niveles constitutivos de enzimas dependientes de CYP450 (Hällstrom, 1984). Por ejemplo, la resistencia al diclorodifeniltricloroetano (DDT) se relaciona con la expresión constitutiva de altos niveles enzimáticos (P450 y GST) (Sobels y Vogel, 1976; Dapkus y Merrell, 1977; Zijlstra, 1987; Wilson, 2001), mientras que la resistencia a insecticidas organofosforados se ha asociado a cuatro genes localizados tanto en el cromosoma 2 como en el 3. Uno de ellos el gen DDT-R se ubica en el cromosoma 2R en posición 64.5 cM, se encuentra en muchas poblaciones y parece estar involucrado en la resistencia metabólica mediada por P450. Es probable que este gen codifique para una molécula represora de uno o varios P450, ya que se ha mostrado que en las cepas susceptibles a pesticidas la sobreexpresión constitutiva puede ser el

resultado de que posean un represor no funcional, como resultado de mutaciones en genes reguladores (Graf *et al.*, 1991a, b; Maitra *et al.*, 2000).

En *Drosophila* y otros insectos, se han reportado altos niveles de actividad de las GST en los cuerpos grasos y en el intestino medio. Ambos tejidos son sitios importantes para la desintoxicación de xenobióticos (Franciosa y Berge, 1995). La inducción de daño genético heredable por xenotóxicos que requieren bioactivación muestra considerable dependencia del genotipo en las moscas. Otras enzimas que pueden estar involucradas en la activación de xenobióticos, incluyen acetil transferasas y sulfoniltransferasas. (Wilkinson y Brattsten, 1972; Hällstrom, 1984; Zijlstra 1987).

## **Azida de sodio (NaN<sub>3</sub>)**

### **Generalidades**

La azida de sodio, es una sal altamente soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y relativamente estable. Reacciona con electrófilos así como con nucleófilos. En la NaN<sub>3</sub>, el ión azida (N<sup>-3</sup>) es lineal y posee un centro de simetría, es decir, tiene igual distancia N-N. Por su estructura, el grupo azida es excelente para el inicio de la síntesis de una amplia variedad de compuestos como las aminas y los triazoles (Index-Merck, 1989).

Se le ha usado para sintetizar derivados nucleosídicos de azida que se utilizan como compuestos con fotoafinidad para estudiar la unión de ligandos a las proteínas (Kleinhofs *et al.*, 1978; Beyer y Walter 1987; Cotton y Wilkinson, 1988; Braun *et al.*, 1997). La exposición de azidas inorgánicas a ácido sulfhídrico concentrado produce ácido hidrazoico (HN<sub>3</sub>), el cual es volátil, tóxico y explosivo.

Se considera que la toxicidad del ácido hidrazoico es similar a la de cianida de hidrógeno. Así, todas las soluciones de  $\text{NaN}_3$  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  $37^\circ \text{C}$ , por lo que escapa rápidamente en el aire a partir de soluciones acuosas (Kleinhofs *et al.*, 1978). Los múltiples usos de la azida de sodio abarcan a la agricultura (funguicida en la conservación de vinos, estimulante de la germinación, nematocida y desinfectante de granos); la medicina (conservador en productos de diagnóstico y tratamiento de hipertensión), la industria automotriz (para inflar bolsas de aire en automóviles). En promedio, cada bolsa de aire (seguridad) de los vehículos lleva 300 gramos de  $\text{NaN}_3$ . Cuando los vehículos salen fuera de uso las bolsas son removidas y almacenadas sin ninguna norma de inspección (Gordon *et al.*, 1990; Betterton, 2003). En investigación se utiliza como inhibidor respiratorio y bactericida selectivo ya que suprime a la catalasa, a la peroxidasa y desacopla a la citocromo oxidasa (Smith y Wilcox, 1994). En los últimos diez años se ha demandado una producción de más de 5 millones de kg de azida por año, lo que ha aumentado el riesgo de exposición a este agente tóxico (Nilan *et al.*, 1973; Tomlinson, 1980; Index Merck, 1989; Betterton, 2003).

La toxicidad de la  $\text{NaN}_3$  ha sido reportada en gran variedad de organismos: bacterias, algas, ciliados, gusanos, crustáceos, insectos, plantas superiores y vertebrados, aunque los resultados han sido contrastantes, aún entre las mismas especies (Kleinhofs *et al.*, 1978). En el ambiente laboral, la inhalación accidental de azida provoca inflamación de las mucosas y disminución de la presión sanguínea (70/50) (Kleinhofs *et al.*, 1975) y su ingesta accidental provoca

alteraciones en el sistema nervioso central, dolor de cabeza, asfixia, pulso acelerado, náusea, vómito y paro cardiaco (Gordon *et al.*, 1990).

### **Efecto de la azida en las enzimas**

La  $\text{NaN}_3$  inhibe a la catalasa y la oxidación de la citocromo c (como ácido libre, - $\text{HN}_3$ ), la reacción indofenol y la transferencia de electrones en la cadena respiratoria. La reacción de la azida con hemoproteínas se lleva a cabo como ión disociado (Kleinhofs *et al.*, 1978; Stryer, 1995). En células musculares de mamífero la  $\text{NaN}_3$  bloquea la actividad de la citocromo oxidasa (COX) al unirse al metal de la enzima, lo que ocasiona la disociación de la enzima y la concomitante pérdida de su función (Nicholls y Ferguson, 1992; Berndt *et al.*, 2001) (Cuadro 3). En general, la inhibición enzimática provocada por la  $\text{NaN}_3$  resulta en acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Leary *et al.*, 2002). En levaduras, inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas y en *S. typhimurium*, suprime la síntesis de ADN en presencia de ATP exógeno, por lo que se ha sugerido que esta inhibición de la síntesis de ADN no se debe al desacoplamiento de la fosforilación oxidante o de la respiración (Kleinhofs *et al.*, 1978). En general, el bloqueo de la actividad enzimática se potencia a valores bajos de pH (Nilan *et al.*, 1973; Kleinhofs *et al.*, 1978; Tomlinson, 1980). En la cebada, retarda el crecimiento de semillas germinadas e inhibe la actividad de la catalasa y peroxidasa de extractos de semillas ( $\text{NaN}_3$ , 12.5 mM, pH 3) (Veleminsky *et al.*, 1977). En fracciones mitocondriales de hígado de rata, la azida provoca la acumulación de un intermediario no identificado de la fosforilación oxidante (De Flora *et al.*, 1979). Los resultados positivos obtenidos en *Drosophila* empleando pH de 6.5 en el ensayo

somático de SMART muestran que en este organismo no es necesario un pH ácido en la solución administrada para detectar la mutagénesis de azida, porque en el tracto intestinal de la mosca el pH es cercano a 2 de forma natural (González-César, 1994; Guzmán-Rincón *et al.*, 1998).

Cuadro 3. Efecto de la azida de sodio (NaN <sub>3</sub> ) sobre algunas enzimas				
Enzima	mM	pH	Efecto	Referencia
Uricasa	5	6.8	Inhibida 40%	Kleinhofs <i>et al.</i> , 1978
Aminoxidasa	10	-	Inhibida 8%	
Anhidrasa carbónica	3	7	Inhibida 8%	
Aldehído oxidasa	1	6	Inhibida 80%	
Mieloperoxidasa	1	-	Inhibición total	
Fosforibuloquinasa	1	-	No inhibida	
Superoxido dismutasa (SOD)	1	-	Inhibida	Kleinhofs <i>et al.</i> , 1978 Leary <i>et al.</i> , 2002
Carboxilpeptidasa	-	-	No inhibida	Kleinhofs <i>et al.</i> , 1978
Citocromo oxidasa (COX)	-	-	Inhibida	Kleinhofs <i>et al.</i> , 1978 Leary <i>et al.</i> , 2002

### Mutagénesis

La mutagenicidad de la NaN<sub>3</sub> se asocia con el metabolito L-azidoalanina (Fig. 7), compuesto fuertemente polar, soluble en agua, alcohol y dimetil-formamida. La



enzima O-acetilserina sulfidrilasa (OASS) dimérica está involucrada en su transformación. La L-cisteína inhibe específicamente la síntesis del metabolito mientras que la OASS revierte esta inhibición al acetilar a la L-cisteína (Owais *et al.*, 1978, 1981a, b; Wael *et al.*, 2004; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2004; Rabeh *et al.*, 2005; Bonner *et al.*, 2005; Bommarus y Polizzi, 2006).

Los efectos mutagénicos de la azida de sodio se han reportado en diferentes organismos (Cuadro 4). En *S. aureus*, la  $\text{NaN}_3$  incrementó la frecuencia de mutantes resistentes a penicilina y estreptomicina (Nilan *et al.*, 1973). En *B. subtilis*, la azida (1 mM) no indujo mutaciones, entrecruzamiento o mal apareamiento de bases (Kleinhofs *et al.*, 1975); en contraste, en cepas deficientes en reparación por escisión (*uvrB*) de *S. typhimurium* produjo revertantes *his+* y sustitución de pares de bases, pero su efecto fue disminuido 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 remojadas con  $\text{NaN}_3$  (1-50 mM, pH 3), se inhibió la germinación e incrementó, de acuerdo con la concentración, la frecuencia de rompimientos sencillos de cadenas de ADN de embriones no germinados; en dosis subletales (10 y 12.5 mM) indujo una baja frecuencia de rompimientos de cromátidas y traslocaciones en células de la raíz (Veleminsky *et al.*, 1977).

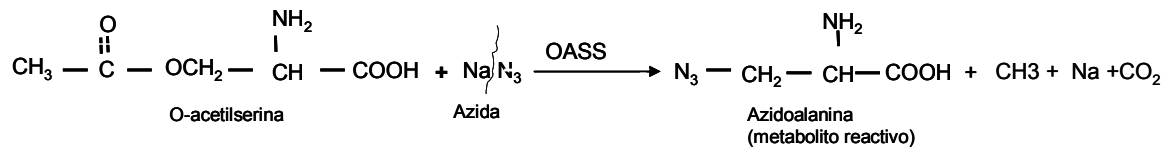


Fig. 7 Biotransformación de la azida a su metabolito azidoalanina mediado por la enzima acetilserinasulfidrilasa (Owais y Gharaibeh, 1990)

Owais *et al.*, (1978) fueron los primeros en reportar evidencia experimental de la presencia de un metabolito mutagénico formado *in vivo* en embriones de cebada expuestos a  $\text{NaN}_3$ . Trataron semillas Himalaya de cebada con azida (1 mM) en un amortiguador de fosfato 100 mM por 2 horas. Los extractos de embriones tratados con azida fueron altamente mutagénicos para la cepa bacteriana TA1530. Además, la mutagenicidad se incrementó en semillas germinadas, en comparación con las no germinadas (Sander *et al.*, 1978). En células *rad2-5* de *S. cerevisiae* induce mutantes resistentes a ciclohexamida (Veleminsky *et al.*, 1979), pero en concentraciones de 3.5 a 100 mM, no incrementó la frecuencia de mutaciones en la región adeneina-3 (*ad3*) en restos de conidios y en conidios completos que crecen en cultivos de heterocariontes 12 y 59 de *N. crassa* (Tomlinson, 1980). En semillas de *Brachypodium distachyon* la azida de sodio indujo 10 % de mutantes a 10 mM mientras que a 100 mM se obtuvo el 45 % (Engvild, 2005). Algunos reportes sugieren que el PH podría participa en el efecto de la  $\text{NaN}_3$ . En líneas celulares de mamíferos, fibroblastos humanos EUE y de criceto chino V79, es citostática y citotóxica a 30, 100 y 300  $\mu\text{g/ml}$ , en medio ácido (Slamenova y Gabelova, 1980). En otro reporte, utilizando dos líneas celulares V79 (una epiteloide derivada de pulmón de criceto chino) y V7979 (sublínea de V79

deficiente en reparación del ADN), la azida fue menos citotóxica e indujo más mutantes en la línea celular V7979 que en la progenitora V79 (James *et al.*, 1980).

Cuadro 4. Resumen de los resultados obtenidos en pruebas de mutagénesis con tratamientos de azida de sodio.

Organismo	pH	Prueba/Evento terminal	Concentración [Mm]	Resultado	Referencia
<b>Bacillus subtilis</b>	-	Entrecruzamiento	1	-	Kleinhofs <i>et al.</i> , 1975
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Resistentes a penicilina y estreptomina	-	+	Nilan <i>et al.</i> , 1973
<i>Salmonella typhimurium</i>	3	Cepa TA 1530 Revertantes his+	1	++	Kleinhofs y Smith, 1976
	3				
	5-8	Pretratamiento con S-9 y jugo gástrico	100 microgr/placa	+	De Flora <i>et al.</i> , 1979
<i>Neurospora crassa</i>	3-8	Región ad-3	3.5	-	Tomlinson, 1980
Cebada	3	Rompimientos cromatídicos	1	+	Veleminsky <i>et al.</i> , 1979
	3-7	Replicación	1	+	Sander <i>et al.</i> , 1978
Maíz	3	Locus yg 2	1	-	Conger y Carabia, 1977
	-		0.5-1	+	Dotson, 1989
<i>Tradescantia</i>		Micronúcleos		+	Ma <i>et al.</i> , 1994
<i>Vicia faba</i>	-	Rompimientos cromosómicos	-	+	Kanaya <i>et al.</i> , 1994
<i>Drosophila melanogaster</i>	3-4	SLRLT	5-0.1	-	Kamra y Gollapudi, 1979
		SMART	7-14.7	+	Delgado, 1990
				+	González-César y Ramos-Morales, 1997
Criceto chino	7.1	Células V79	-	+	Jones <i>et al.</i> , 1980
	7.1	Células V7979	-	++	
Linfocitos	7.1	ICH	5-50	+	Arenaz y Nilan, 1981

-, negativo ; +, positivo ; ++, mayor respuesta

La azida a 5 y 50 mM en tratamientos de 1 hora incrementó ( $p < 0.05$ ) la frecuencia de ICH en linfocitos (Arenaz y Nilan, 1981). También produjo micronúcleos en *Tradescantia*; pero no en *Arabidopsis thaliana* (Kanaya *et al.*, 1994; Grant y Salamone, 1994).

En *Drosophila*, la inyección de soluciones amortiguadas de azida (0.1, 1.0 y 5 mM, pH= 4.6) no provocó mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (Kamra y Gollapudi, 1979), pero la exposición aguda por 6 h a  $\text{NaN}_3$  [7.3-14.7 mM] por alimentación causó una respuesta débil positivo en el incremento de la frecuencia de mutación y recombinación somática (Delgado, 1990). El tratamiento subcrónico utilizando cepas estándar y con alta bioactivación (con altos niveles constitutivos de CYP6A2a) y a menores concentraciones confirmó que la azida indujo exclusivamente recombinación mitótica en células de las alas de *Drosophila melanogaster* por exposición crónica. La respuesta de genotoxicidad se redujo considerablemente en las cepas con alta capacidad de bioactivación (González-César, 1994; González-César y Ramos-Morales, 1997). En otro reporte con *Drosophila*, la azida no fue mutagénica en la prueba de letales recesivos ligados al sexo, mientras que su metabolito dio resultados positivos (Sadiq y Owais, 2000).

### **Antimutagénesis**

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

nitrosos en plantas superiores debido a su actividad como atrapador del oxígeno excitado (oxígeno singulete), lo que disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) implicadas en daño oxidante al ADN (Cuadro 5) (Gichner y Veleminsky, 1988; Verna *et al.*, 1998).

Cuadro 5. Efectos antimutagénicos de la azida de sodio sobre compuestos N-nitrosos observados en diferentes sistemas (Gichner y Velemnisky, 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 (MNUA) y N-metil-N-nitrosouretano (MNUA)
Cebada	Postratamiento (3 hrs)	7	Disminuye la frecuencia de mutaciones inducidas por N-metil-N-nitrosourea (MNU)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Simultáneo	7	Reduce la frecuencia de mutaciones inducidas por N-etil-N-nitrosourea (ENU) y N-metil-N-nitrosourea (MNU)
<i>Vicia faba</i>	Pretratamiento	7	Reduce el efecto clastogénico provocado por N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), y N-nitrosometil-fenilamina (NMFA)

En *E. coli* la azida previno la acción letal, la inhibición de la síntesis y la degradación de ADN producida por N-metil-Nitrosourea (MNU) y N-metil-n-nitrosouretano (MNUA). Sin embargo, no tuvo 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 la MNU o el MNUA (Gichner y Velemnisky, 1988).

## **HIPÓTESIS**

La heterogeneidad en la respuesta a la exposición a  $\text{NaN}_3$ , especialmente a concentraciones altas observada en diferentes organismos está asociada a menor eficiencia en la producción del metabolito reactivo (azidoalanina) o a una mayor capacidad de desintoxicación.

## **OBJETIVO GENERAL**

Aislar dos subpoblaciones de cepas de *Drosophila melanogaster* empleadas en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) para resistencia a la azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar el índice de sobrevivencia de moscas seleccionadas y no seleccionadas expuestas a altas concentraciones de azida de sodio.
- Comparar la respuesta de genotoxicidad de moscas seleccionadas y no seleccionadas expuestas a azida de sodio.
- Comparar la respuesta de genotoxicidad de moscas seleccionadas y no seleccionadas expuestas a N-Nitrosodimetilamina (NDMA).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de *Drosophila melanogaster*

Se usaron dos cepas de *D. melanogaster* que se utilizan para la evaluación de mutación y recombinación somáticas:

a) Hembras  $flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^o\ sep\ bx^{34e}\ e^s\ Bd^S$  (en breve,  $flr^3/TM3, Bd^S$ ). El gen  $flr^3$ , que modifica el aspecto de los tricomas (pelos) de las alas de las moscas, tiene expresividad variable por lo que el tricoma puede aparecer como un depósito de quitina en la superficie del ala o verse como una flama; es letal en condición homocigótica, pero viable a nivel celular. Para mantener a la mutación  $flr^3$ , se utiliza el cromosoma balanceador  $TM3, Bd^S$ , que porta múltiples inversiones y al marcador letal dominante  $Bd^S$  (Beaded Serrate) que produce una indentación en el borde de las alas de las moscas portadoras; así, en cada generación sólo se recuperan moscas heterocigóticas para las mutaciones  $flr^3$  y  $Bd^S$ .

Sistema de letales balanceados de la cepa $flr^3/TM3, Bd^S$			
		Gametos masculinos	
		$flr^3$	$TM3, Bd^S$
Gametos femeninos	$flr^3$	$flr^3/flr^3$ Letal	$flr^3/TM3, Bd^S$ hembras y machos viables
	$TM3, Bd^S$	$flr^3/TM3, Bd^S$ hembras y machos viables	$TM3, Bd^S/TM3, Bd^S$ Letal



b) Machos *mwh/mwh*. La mutación *mwh* (*multiple wing hair*) produce la formación de múltiples tricomas en lugar de sólo uno, como en las moscas de tipo silvestre. Se localiza distalmente en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.03 unidades de mapa (u.m.) (Lindsley y Grell, 1968; Lindsley y Zimm, 1985, 1992)

### Ensayo somático

Se utilizó la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART, Somatic Mutation and Recombination Test), la cual se basa en el uso de dos marcadores fenotípicos para los tricomas (pelos) de las alas de las moscas. A partir de la cruce de hembras *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>* x machos *mwh/mwh* se obtienen dos tipos de progenie: moscas libres de inversiones y moscas portadoras de inversiones:

Progenie de la cruce <i>flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup></i> x <i>mwh/mwh</i>			
		Gametos masculinos	
		<i>mwh</i>	<i>Fenotipo</i>
Gametos femeninos	<i>flr<sup>3</sup></i>	<i>flr<sup>3</sup>/mwh</i> (libres de inversión)	Hembras y machos con alas de tipo silvestre
	<i>TM3, Bd<sup>S</sup></i>	<i>TM3, Bd<sup>S</sup>/mwh</i> (portadoras de inversiones múltiples)	Hembras y machos con alas con muescas en el borde (aserradas)

Las larvas de los dos tipos de progenie no se distinguen fenotípicamente y son tratadas simultáneamente pero cuando adultas pueden diferenciarse por la forma de sus alas: tipo silvestre en las libres de inversión y con muescas en el borde en las portadoras de inversiones múltiples. Durante el desarrollo larvario pueden ocurrir eventos genéticos como: mutación puntual, no disyunción, pérdida parcial de cromosomas y recombinación entre los dos marcadores (*mwh* y *flr*<sup>3</sup>); estos eventos pueden derivar en la formación de una mancha simple, *mwh* o *flr*<sup>3</sup>. Si la recombinación ocurre entre el marcador *flr*<sup>3</sup> y el centrómero se produciría una mancha gemela; por su origen, éstas son indicadores confiables de que ha ocurrido recombinación mitótica. La figura 6 muestra los eventos genéticos que forman manchas en las alas de las moscas. Como las moscas portadoras del cromosoma balanceador no pueden evidenciar la ocurrencia de eventos de recombinación, en esta tesis solo se utilizaron las moscas libres de inversiones para el ensayo somático. Por su tamaño, las manchas pueden ser pequeñas (1 a 2 células) o grandes ( $\geq 3$  células), las primeras son mucho más frecuentes; pero las manchas grandes son indicadores confiables de que el evento que conduce a la formación de una mancha implica un cambio en el material genético y que es heredable a nivel mitótico. Dos manchas se consideran eventos independientes si están separadas por tres hileras de tricomas con aspecto regular.

### **Pruebas preliminares con azida de sodio**

En la primera parte del trabajo se realizó la selección de dos cepas que se utilizan para la evaluación de mutación y recombinación somática en células de las alas

de *Drosophila* (cepas *flr* y *mwh*). El diseño experimental realizado se muestra en la figura 8.

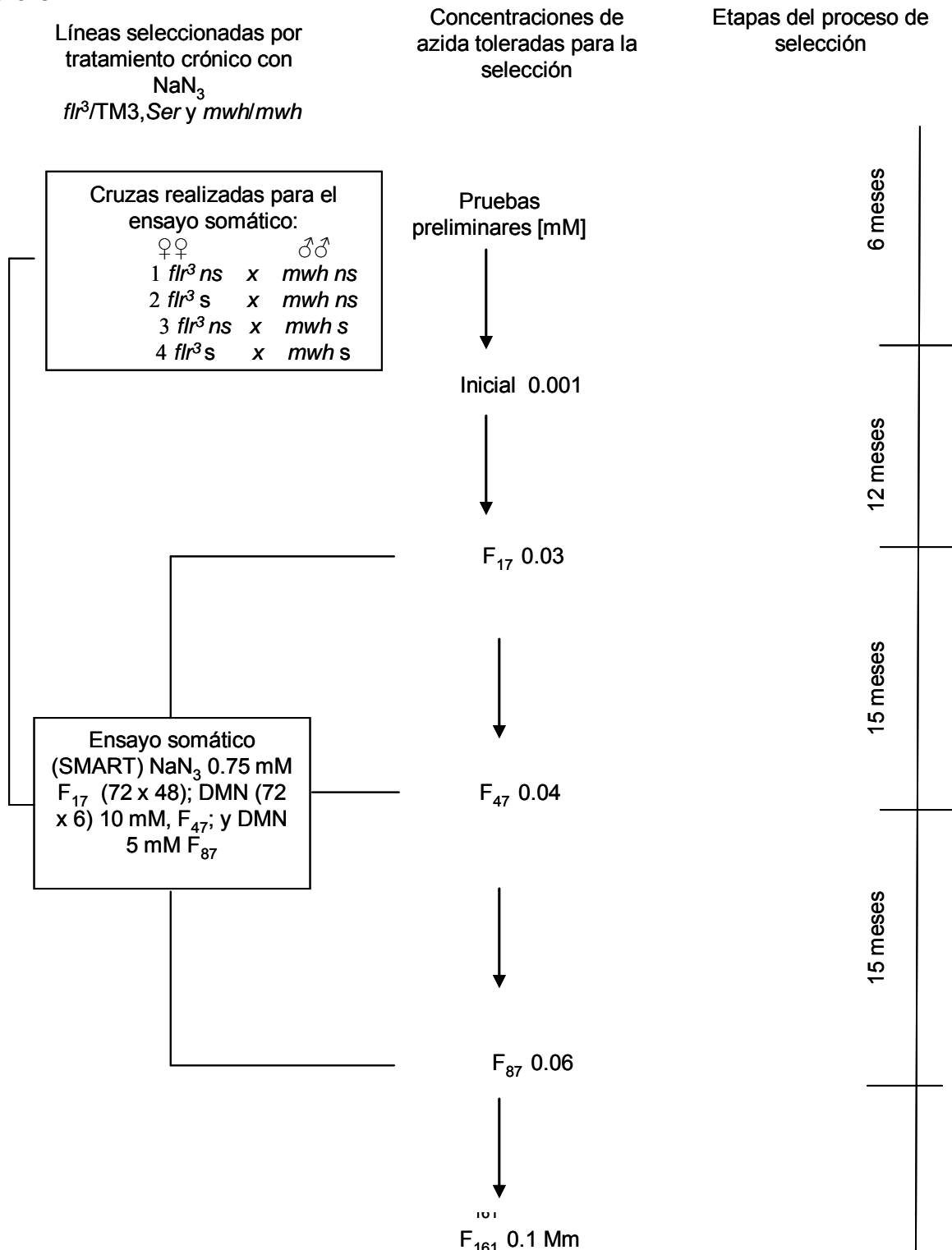


Fig. 8 Esquema que muestra el proceso de selección realizada así como las pruebas de genotoxicidad con  $\text{NaN}_3$  y NDMA: s = seleccionadas; ns = no seleccionadas.

Los organismos se cultivaron en presencia de  $\text{NaN}_3$ , a una concentración inicial de 0.001 mM para la generación 1 ( $F_1$ ). La selección progresiva se realizó conforme las moscas fueron tolerando mayores cantidades en la concentración de la  $\text{NaN}_3$  en el medio de cultivo (Fig. 9a). Así los organismos permanecieron en estas condiciones hasta que el índice de sobrevivencia de las moscas cultivadas en presencia de  $\text{NaN}_3$  y el índice de sobrevivencia de las moscas testigo (sin azida) fueran similares. Entonces se iniciaba una nueva fase de selección por aumento de la cantidad el compuesto, repitiendo el procedimiento (Fig. 9b). Actualmente los cultivos de las dos cepas (*flr* y *mwh*) se mantienen a una concentración de 0.1 mM para la  $F_{161}$ . De forma paralela se cultivaron por separado a las dos cepas (*flr* y *mwh*) en medio sin azida como cepas testigo.

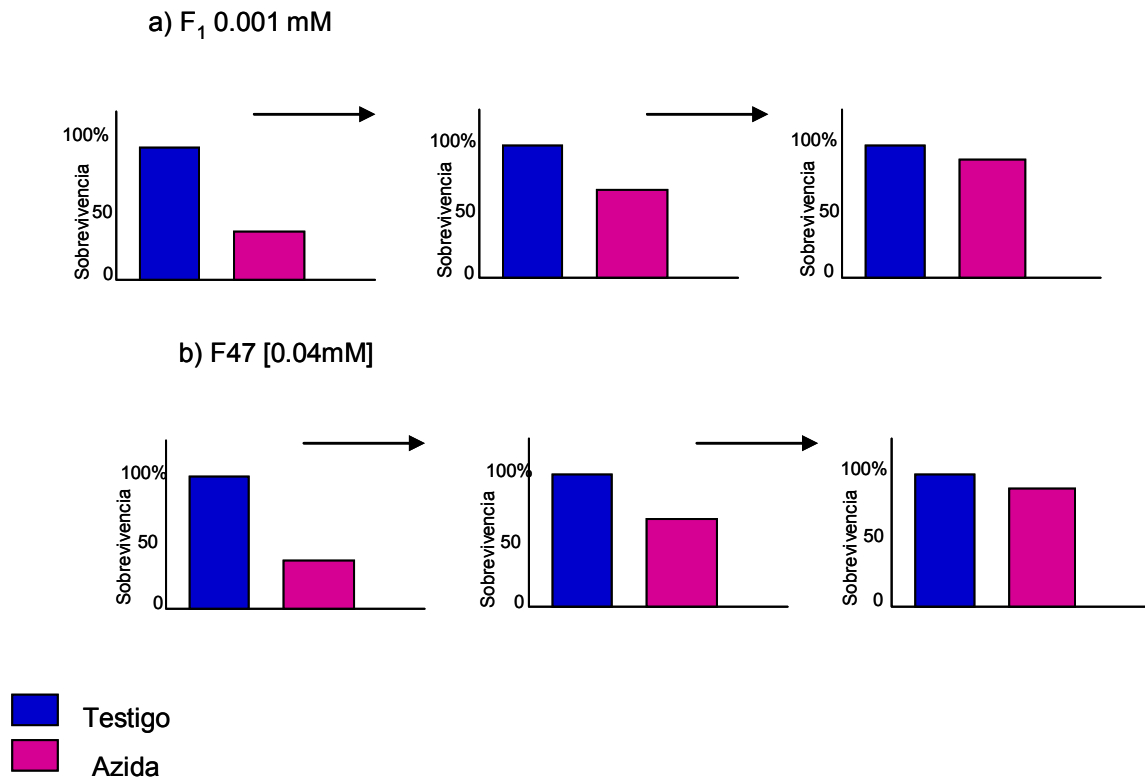


Fig. 9 Proceso cíclico de la selección con la  $\text{NaN}_3$

### **Cruzas experimentales**

Hembras vírgenes de la cepa  $flr^3/TM3, Bd^S$  se cruzaron con machos  $mwh/mwh$ . Los cultivos se mantuvieron a 25°C y a 60% de humedad relativa.

Para evaluar el efecto de la selección en las cepas materna y paterna se realizaron cuatro tipos de cruzas con moscas resistentes a la  $NaN_3$  (s) y moscas estándar (ns). Se indica primero el genotipo de la hembra y después el del macho:

1)  $flr^3_{ns} \times mwh_{ns}$

3)  $flr^3_{ns} \times mwh_s$

2)  $flr^3_s \times mwh_{ns}$

4)  $flr^3_s \times mwh_s$

### **Sincronización de cultivos y obtención de larvas**

Tres días después de realizadas la cruzas en frascos con medio de cultivo estándar, los progenitores se transfirieron a frascos independientes con medio fresco (Ramos *et al.*, 1993) para recobrar huevos por un período de 8 horas. Se retiraron los progenitores y tres días después las larvas de  $72 \pm 4$  horas de edad de cada tipo de crusa se extrajeron por flotación con una solución de sacarosa al 20% (Nöthiger, 1970). Las larvas se vierten en un embudo de separación de 4 mm de diámetro y se enjuagan para retirar residuos de medio de cultivo. Posteriormente se colectan en una malla de nylon.

## Tratamientos para evaluar la resistencia

### a) Subcrónico

Grupos de 100 a 150 larvas de  $72 \pm 4$  horas de edad se introdujeron en tubos homeopáticos que contenían 1.5 g de medio de cultivo instantáneo y 7.5 ml de una solución recién preparada de  $\text{NaN}_3$  a 0.75 mM o de agua destilada (testigo negativo); las larvas permanecieron en los tubos hasta completar su desarrollo para obtener una exposición de 72 x 48 h (Fig. 10).

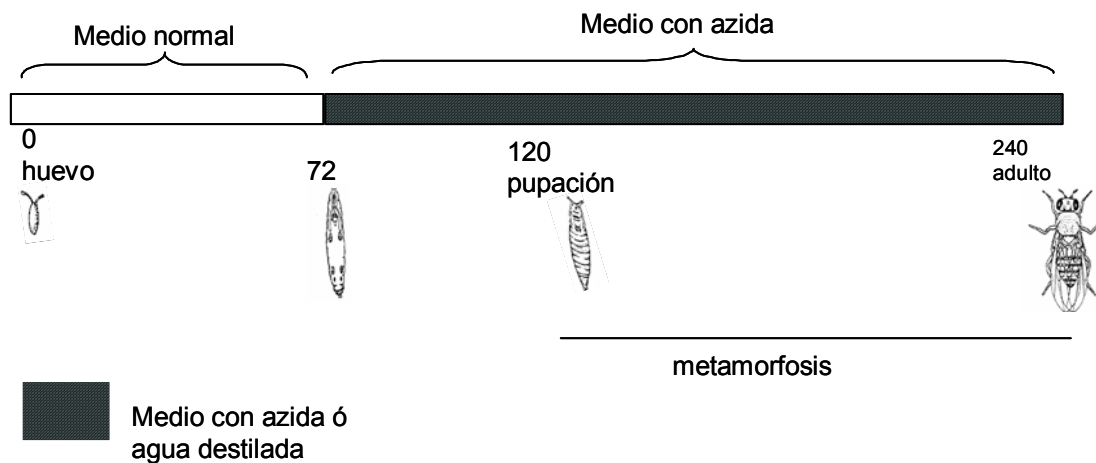


Fig. 10 Protocolo utilizado en el tratamiento subcrónico con  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM] con moscas seleccionadas ( $F_{17}$ ) y no seleccionadas.

### b) Agudo

Grupos de 100 a 150 larvas de  $72 \pm 4$  horas de edad se transfirieron a tubos homeopáticos, con una gasa de nylon en uno de los extremos y un tapón de poliuretano en el otro; cada tubo se introdujo en vasos de precipitado de 10 ml de capacidad que contenían 50 mg de celulosa en polvo (Merck) y 0.3 ml de la solución de NDMA. Después de 6 horas de tratamiento, las larvas se enjuagaron

con agua corriente y se colocaron en tubos homeopáticos con medio de cultivo fresco, donde permanecieron hasta completar su desarrollo (Fig. 11). Como disolvente y testigo negativo se utilizó sacarosa al 5%.

Tanto del tratamiento agudo con la NDMA como del subcrónico con la  $\text{NaN}_3$  se hicieron al menos tres repeticiones de cada experimento y se compararon los resultados obtenidos en las series experimentales y su testigo correspondiente.

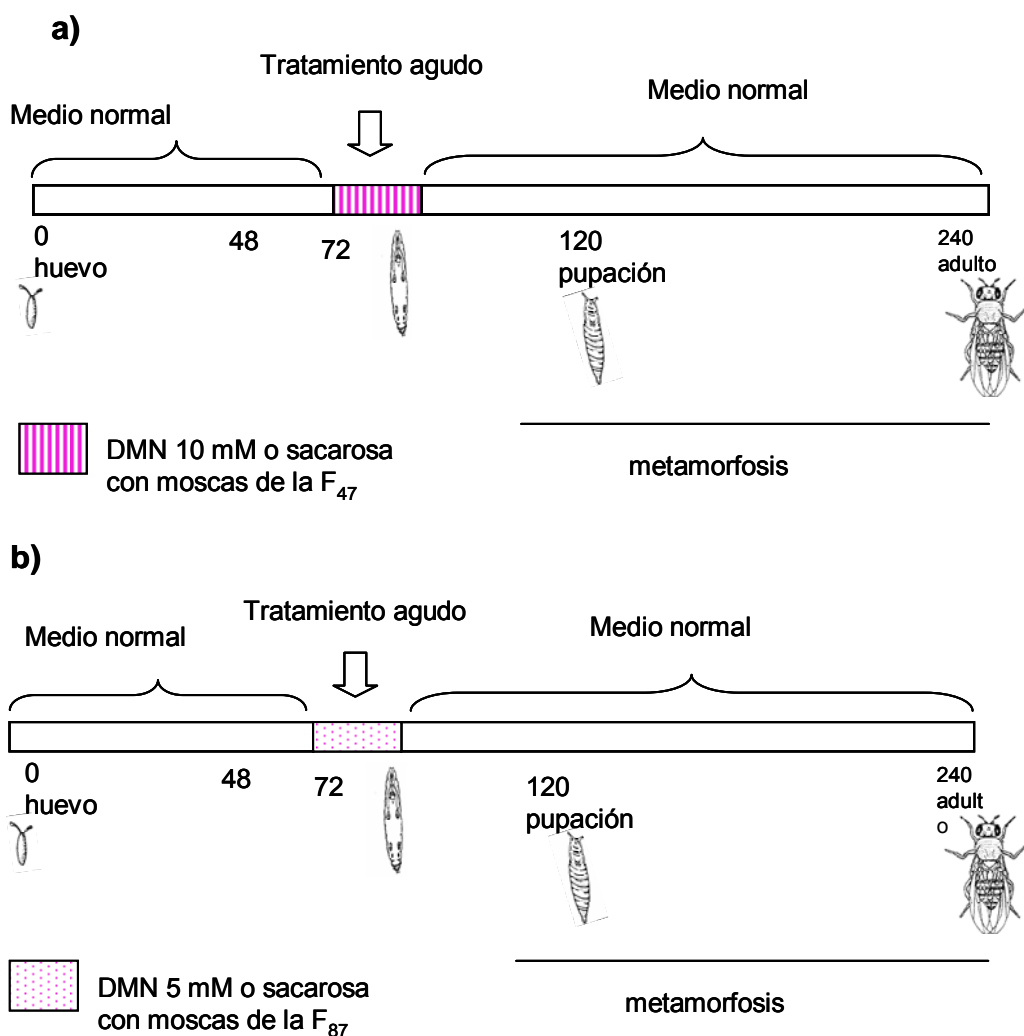


Fig. 11 Protocolos utilizados para los tratamientos con la N-nitrosodimetilamina con moscas seleccionadas ( $F_{47}$  y con la  $F_{87}$ ) y no seleccionadas

## Procesamiento del material

Los adultos recobrados de cada experimento se cuantificaron por sexo y por fenotipo: las moscas libres de inversión ( $mwh+/+flr^3$ ) tienen las alas de tipo silvestre, mientras que las portadoras del cromosoma balanceador ( $mwh+/TM3, Bd^S$ ) presentan muescas en el borde de las alas debido a la presencia del gen marcador *Serrate* (*aserrado*).

Las moscas se sacrificaron por exceso de anestesia y se fijaron en etanol al 70%, posteriormente se elaboraron preparaciones utilizando 20 alas de hembras y 20 alas de machos por laminilla (Graf *et al.*, 1984). El tamaño de muestra se marcó en 40 alas por cada experimento para el análisis de SMART, para hacer un total de 120 alas registradas por lote experimental.

## Análisis de resultados

i) La frecuencia de manchas de las moscas tratadas con  $NaN_3$  o con NDMA [5 ó 10 mM] se compararon por separado con la de manchas en las alas de su lote testigo correspondiente mediante el programa de cómputo SMART (Frei y Würgler, no publicado). Se prueban dos hipótesis: La hipótesis nula establece que la frecuencia de manchas en el lote testigo es igual a la del lote experimental  $H_0: f_c = f_e$ . La hipótesis alternativa implica que la frecuencia de manchas en el lote experimental es igual a  $m$  veces la frecuencia del lote testigo  $H_1: mf_c = f_e$ , donde  $m$  es un múltiplo que se selecciona de acuerdo con el tipo de manchas a comparar. Para manchas chicas y grandes que son relativamente frecuentes,  $m = 2$ ; para manchas grandes y gemelas, que constituyen eventos más raros,  $m = 5$ .



La combinación de resultados puede llevar a:

	Rechazo de $H_1$		
Rechazo		No ( $1 - \beta$ )	Sí ( $\beta$ )
de $H_0$	No ( $1 - \alpha$ )	Inconcluyente	Negativo
	Sí $\alpha$	Positivo	Débil positivo

En un resultado negativo no se aprecia incremento en la frecuencia de manchas del lote experimental con respecto al lote testigo ( $p > 0.05$ ). Un resultado positivo indica que el aumento en la frecuencia de manchas es significativo ( $p < 0.05$ ). El incremento en la frecuencia de manchas puede ser mayor al del testigo negativo pero no ser igual al múltiplo  $m$  establecido. Un resultado inconcluyente implica que las frecuencias del lote testigo y experimental son iguales y, al mismo tiempo, que la frecuencia experimental es  $m$  veces la del lote testigo, por lo que no es posible tomar alguna decisión.

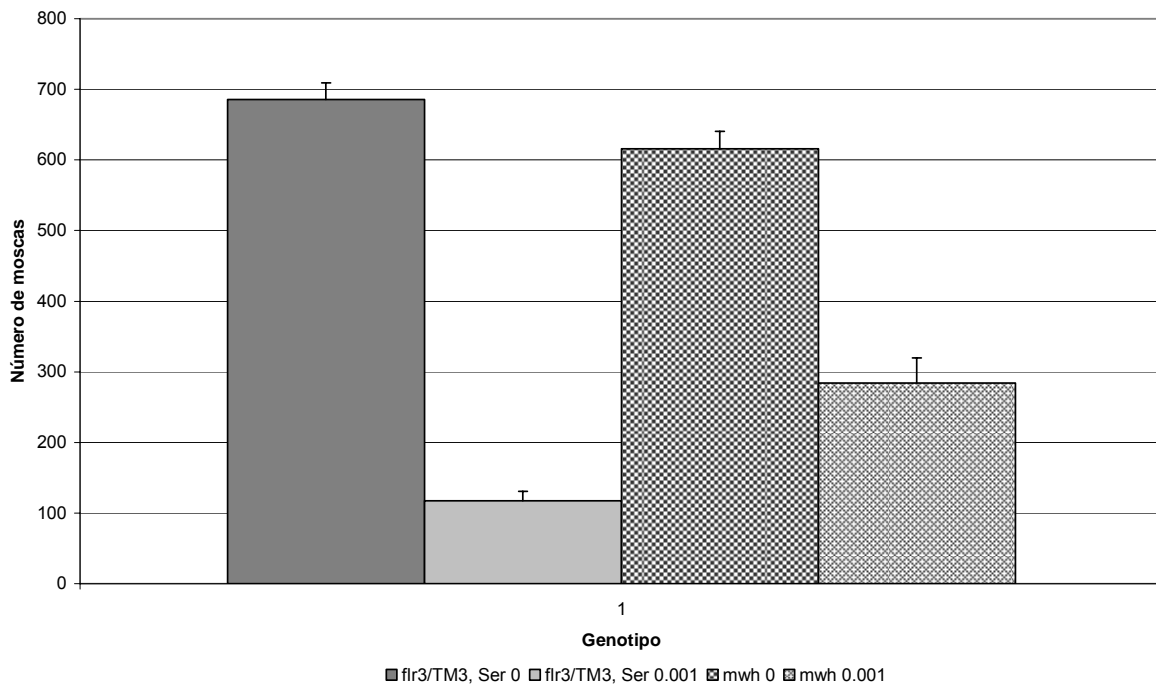
ii) Se comparó cualitativamente la distribución del tamaño de manchas recobradas en cada experimento, con respecto a su testigo correspondiente, bajo la suposición de que si no existe actividad genotóxica, el tamaño de mancha debe ser similar.

iii) Un tercer análisis consistió en la comparación de la distribución del número de manchas por mosca. Normalmente, las moscas no tratadas no muestran manchas en sus alas, pero ocasionalmente pueden presentar una mancha; un evento más raro es que se observen dos o más manchas en las alas. La mediana de la distribución del número de manchas en las alas se comparó mediante la U-de Mann-Whitney, con corrección para empates ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS

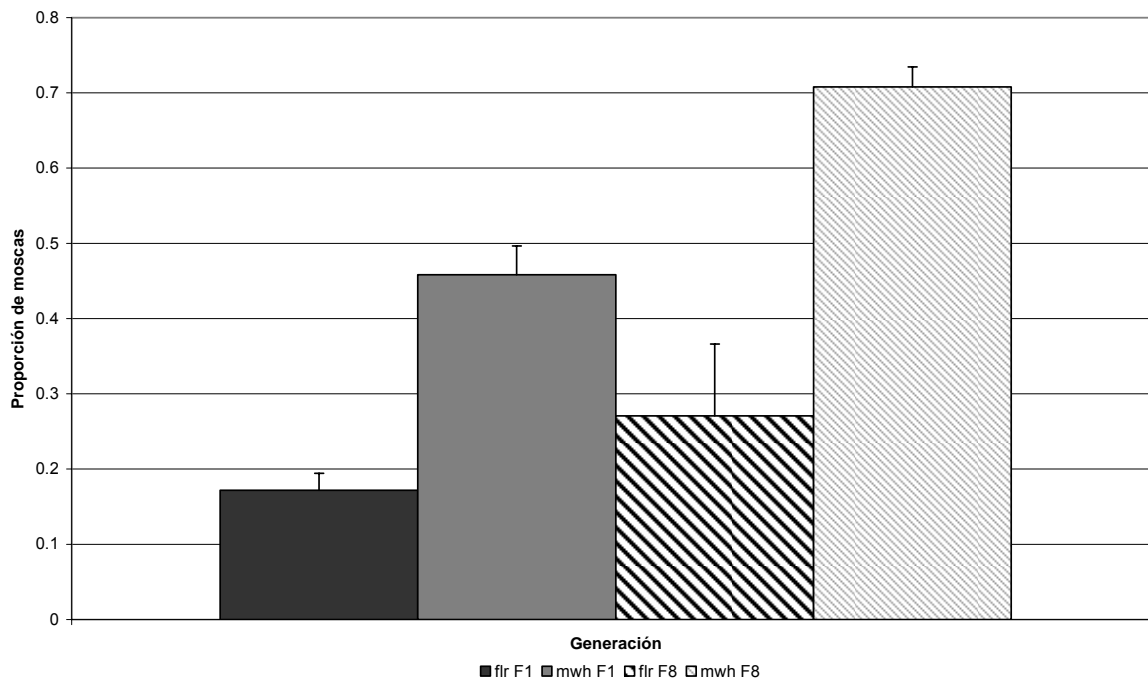
La figura 12 muestra la sobrevivencia recobrada en la primera generación cultivada con  $\text{NaN}_3$  [0.001 mM]. Como se esperaba, de las dos cepas sometidas a selección, se recobró una cantidad claramente menor de moscas de la línea  $\text{flr}^3/\text{TM3}$ ,  $\text{Bd}^S$  debido a las múltiples inversiones en el cromosoma balanceador, comparada con su testigo correspondiente. Las líneas se mantuvieron en esta concentración hasta que la progenie de las moscas seleccionadas y no seleccionadas se obtenía en número similar.

Fig. 12 Sobrevivencia de las cepas  $\text{flr}^3/\text{TM3}$ , Ser y mwh cultivadas en presencia de  $\text{NaN}_3$  [0.001 mM] en la generación F1



La figura 13 compara la proporción de moscas recobradas en ambas líneas seleccionadas, corregida con respecto a sus respectivas líneas no seleccionadas.

Fig. 13 Proporción de moscas recobradas en la F1 y la F8 de las cepas flr<sup>3</sup>/TM3, Ser y mwh cultivadas en presencia de NaN<sub>3</sub> [0.001 y 0.02 mM]

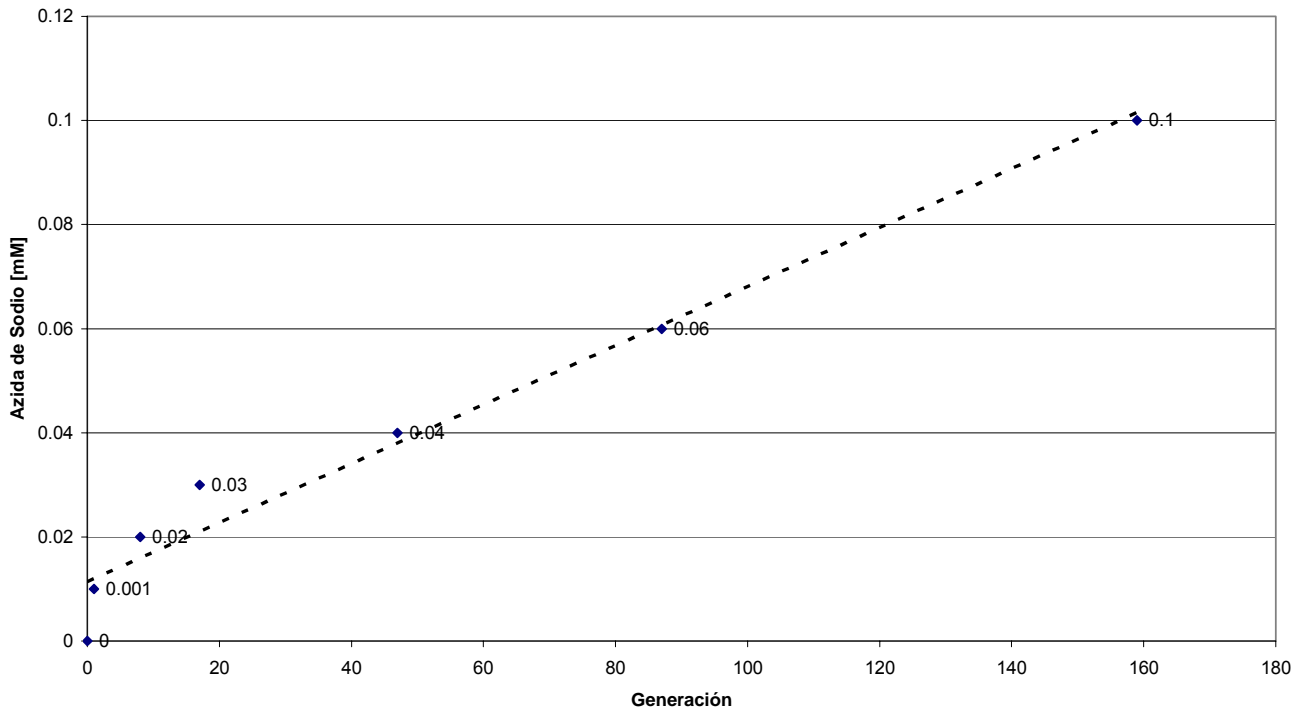


En la F<sub>8</sub> las moscas se cultivaron en una concentración mayor [0.02 mM]. Sin embargo, como puede apreciarse, con respecto a lo obtenido en la generación F<sub>1</sub>, la proporción de moscas en la F<sub>8</sub> es mayor. El proceso de selección continuó aumentándose gradualmente la concentración de NaN<sub>3</sub> en el medio de cultivo. En las generaciones en las que se realizaron ensayos somáticos la concentración de NaN<sub>3</sub> en la que se mantenía a los cultivos fue:

Generaciones de selección	Concentración de NaN <sub>3</sub> [mM]
17	0.03
47	0.04
87	0.06

La selección de las líneas se ha mantenido, de manera que actualmente se han conservado 161 generaciones y la concentración de  $\text{NaN}_3$  que se adiciona a los cultivos es 0.1 mM (Fig. 14).

Fig. 14 Concentración de azida de sodio vs generación de moscas seleccionadas



### Ensayo somático con $\text{NaN}_3$ ( $F_{17}$ )

En una segunda etapa, se comparó el efecto de la exposición semicrónica a la  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM] o a agua destilada en organismos seleccionados (s) y no seleccionados (ns) utilizando cuatro tipos de cruzas (el primer término corresponde a las hembras): a) ns x ns, b) s x ns, c) ns x s y d) s x s (Tabla I, Fig. 15).

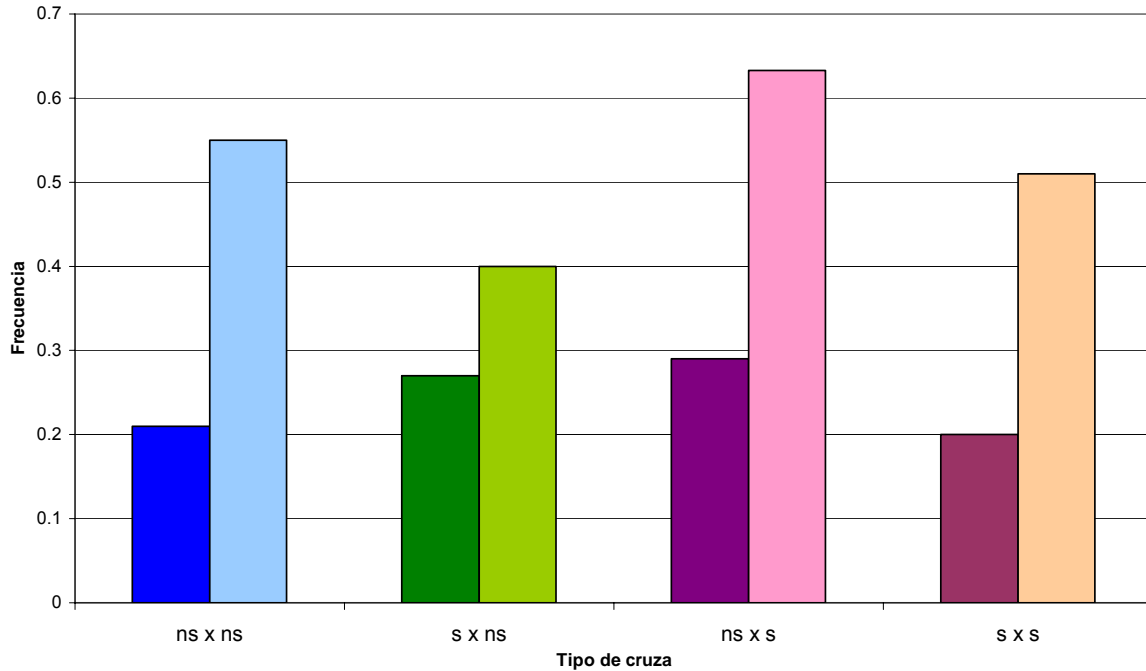
Tabla I. Frecuencia de manchas inducidas con la concentración de 0.75 mM de  $\text{NaN}_3$  en larvas de  $72 \pm 4$  horas de edad. Exposición: 72 X 48 horas ( $F_{17}$ )

Cruza	Número de alas analizadas	Manchas por ala			
		Simples Chicas (1 – 2 células)	Simples Grandes (> 2 células) m = 2	Gemelas m = 5	Totales m = 2
H <sub>2</sub> O destilada					
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwh</i>	120	25 (0.21)	0 (0.0)	0 (0)	25 (0.21)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwh</i>	120	30 (0.25)	2 (0.02)	0 (0)	32 (0.27)
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwhs</i>	120	33 (0.28)	2 (0.02)	0 (0)	35 (0.29)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwhs</i>	120	24 (0.20)	0 (0.0)	0 (0)	24 (0.20)
NaN <sub>3</sub>					
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwh</i>	120	46 + (0.38)	11 + (0.09)	9 + (0.08)	66 + (0.55)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwh</i>	120	42 i (0.35)	6 i (0.05)	0 (0)	48 + (0.40)
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwhs</i>	120	64 + (0.53)	12 + (0.10)	0 (0)	76 + (0.63)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwhs</i>	120	38 + (0.32)	23 + (0.19)	0 (0)	61 + (0.51)

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).+, positivo; w, débil positivo; i, indeterminado. P= 0.05.

No se observaron diferencias entre la progenie recobrada de los lotes testigo ( $p > 0.05$ ) pero la frecuencia de mutación y recombinación somática se incrementó en las cuatro cruza experimentales con respecto a sus correspondientes testigos. El aumento en la frecuencia siguió la tendencia: ns x s > ns x ns = s x s > s x ns.

Fig. 15 Frecuencia de manchas por ala en moscas seleccionadas (s) y no seleccionadas (ns) expuestas a  $\text{NaN}_3$  comparadas con el testigo [0.75 mM] (F17)



Al agrupar el tipo de manchas como pequeñas (1 -2 células), grandes ( $\geq 3$  células) y gemelas (con los dos marcadores fenotípicos formando parte de la misma mancha) (figura 16) se observó que sólo se recobraron manchas gemelas en la cruce con moscas no seleccionadas (figura 16a); en la cruce donde los machos son seleccionados (ns x s) predominaron las manchas chicas (figura 16c), mientras que en la cruce donde ambos progenitores son seleccionados (s x s) (figura 16d) hay una mayor proporción de manchas grandes, comparado con el resto de las cruces; la menor respuesta se obtuvo en la cruce con hembras seleccionadas (figura 16b) .

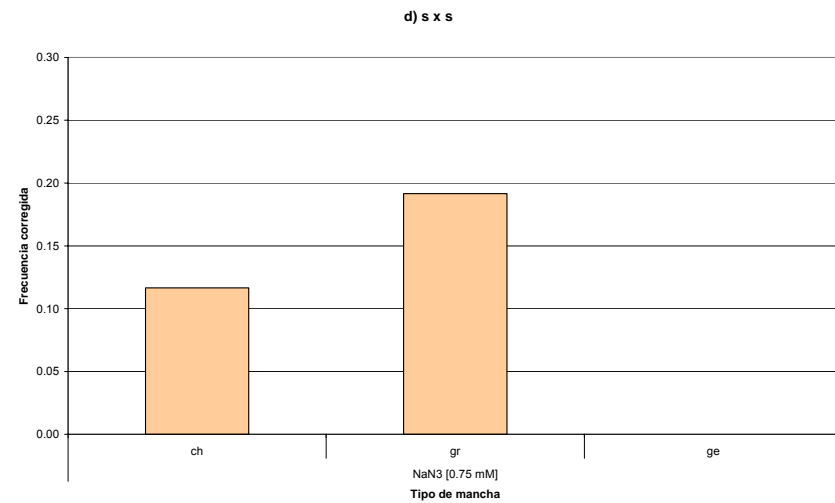
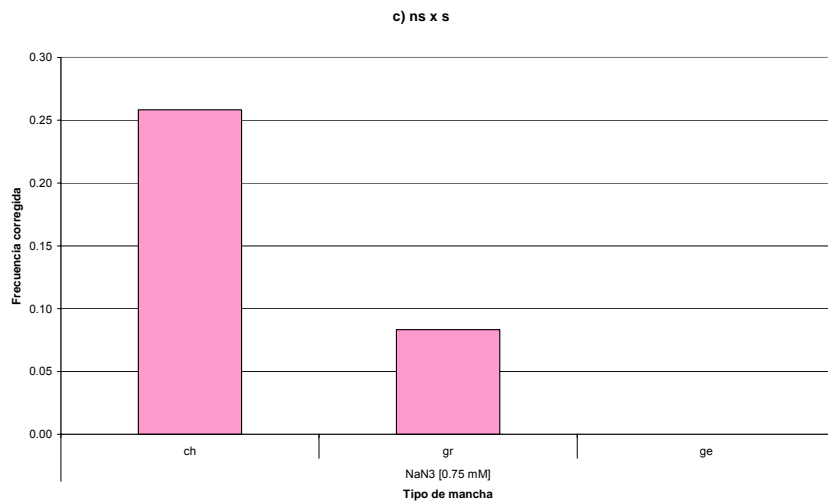
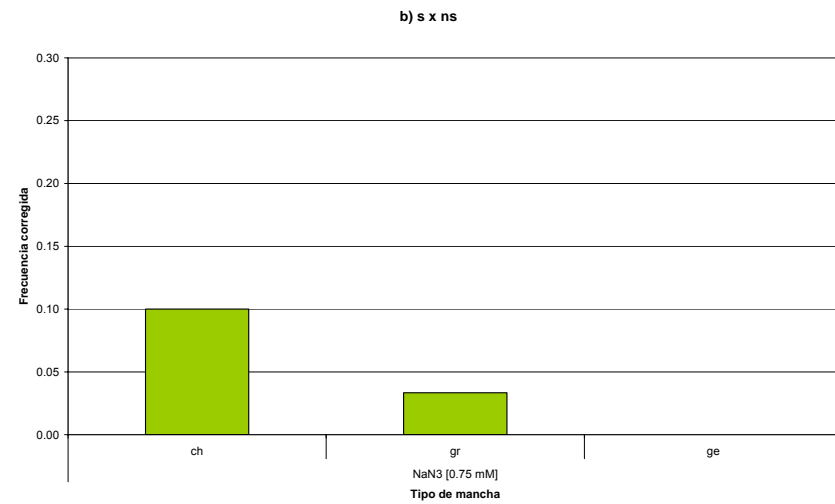
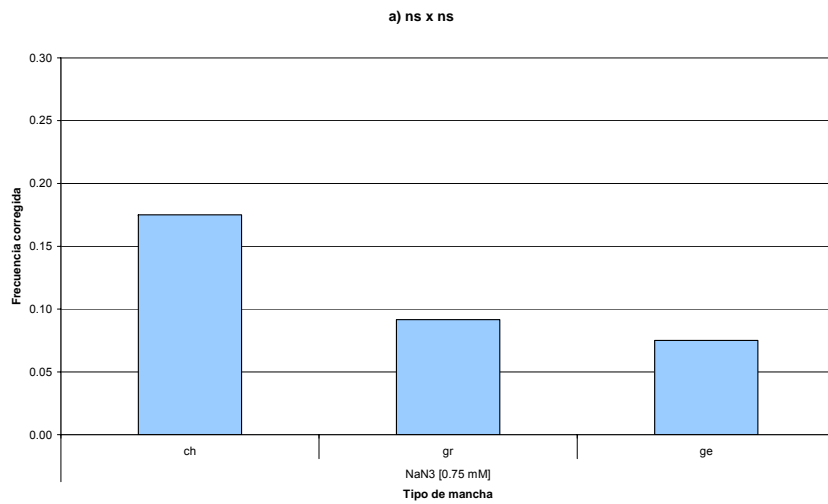


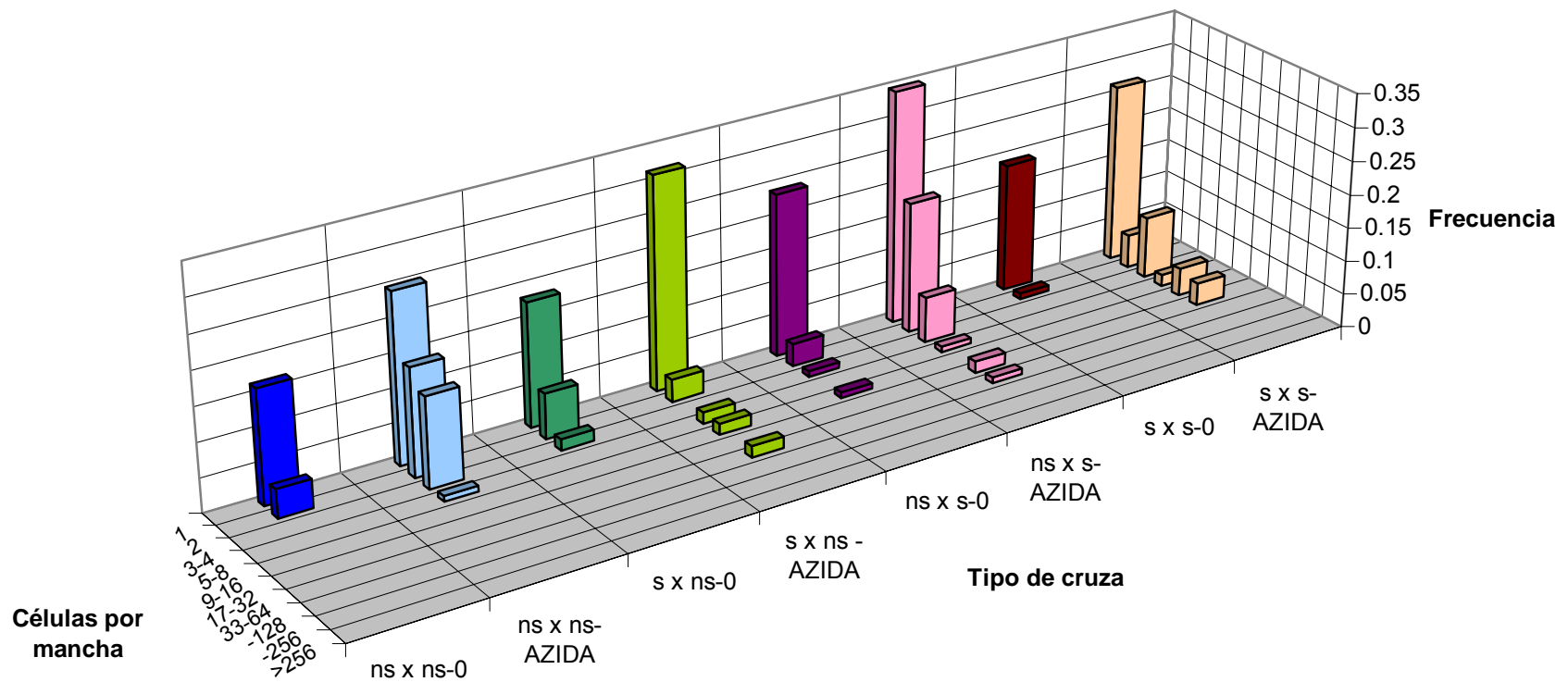
Fig. 16 Frecuencia corregida por tipo de mancha en moscas seleccionadas y no seleccionadas con  $\text{NaN}_3$  (F17) tratadas semicrónicamente con  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM]

En la figura 17 se presenta la distribución del tamaño de mancha recobrado en moscas de las cuatro cruzas experimentales, expuestas a agua destilada o a la  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM].

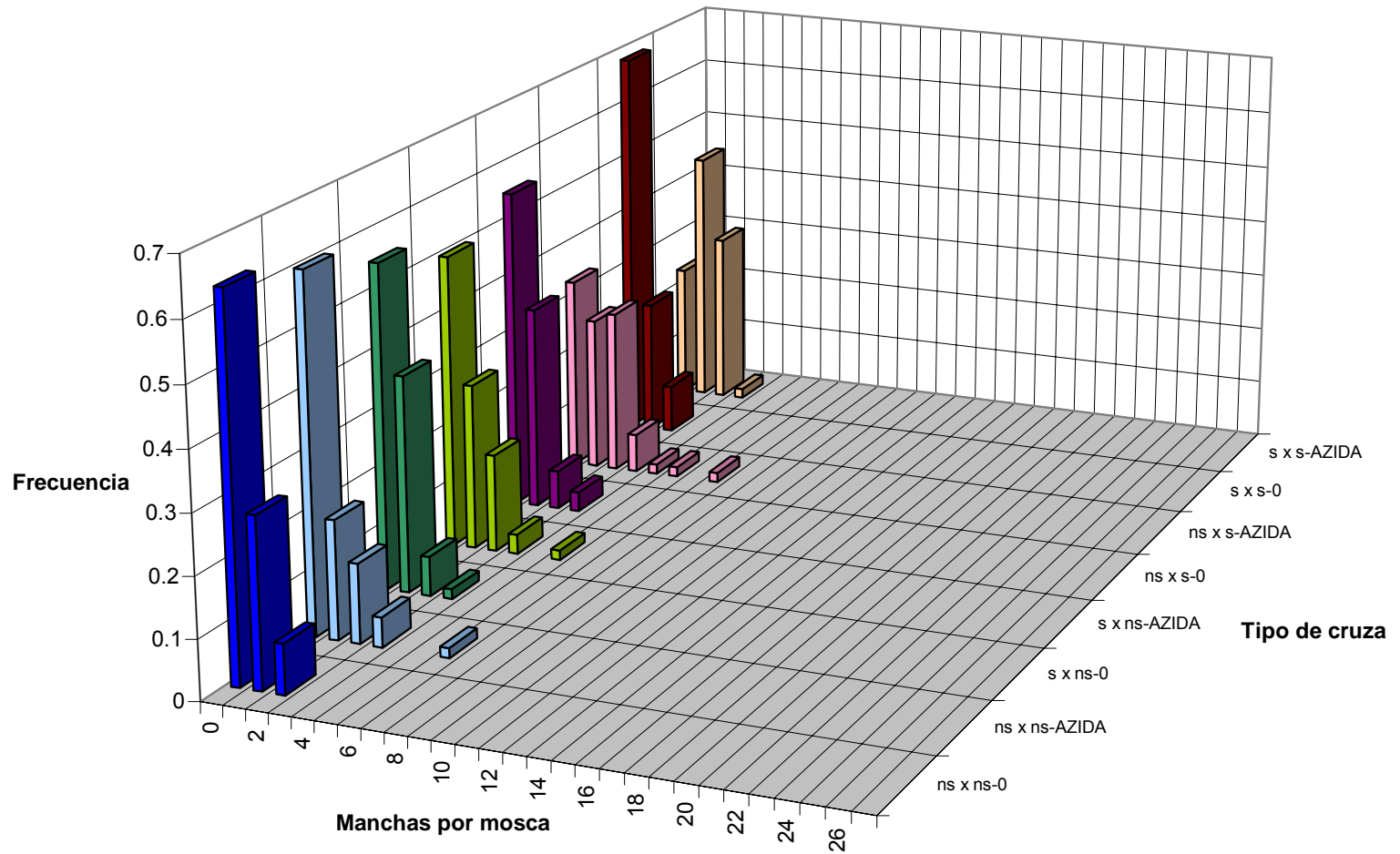
En general, la exposición a la  $\text{NaN}_3$  aumentó el tamaño de mancha en las cuatro cruzas. En la crusa ns x ns, se obtuvieron manchas de hasta 8 células; pero en las cruzas donde al menos una de las líneas progenitoras había estado bajo selección, se recobraron manchas en un rango de 32 a 64 células. Al comparar las distribución del número de manchas por mosca (Fig. 18), sólo se encontraron diferencias en las cruzas donde se seleccionó la línea de machos (ns x s) y donde ambas líneas fueron seleccionadas (s x s) ( $p < 0.05$ ), en los dos casos, la proporción de moscas sin manchas fue menor y se incrementó la proporción de moscas con y fue mayor la de 1 y 2 manchas.



**Fig. 17 Distribución del tamaño de mancha de moscas seleccionadas y no seleccionadas tratadas con NaN<sub>3</sub> [0.75 mM] (F17)**



**Fig. 18 Distribución del número de manchas por mosca en moscas seleccionadas y no seleccionadas tratadas con  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM] (F17)**



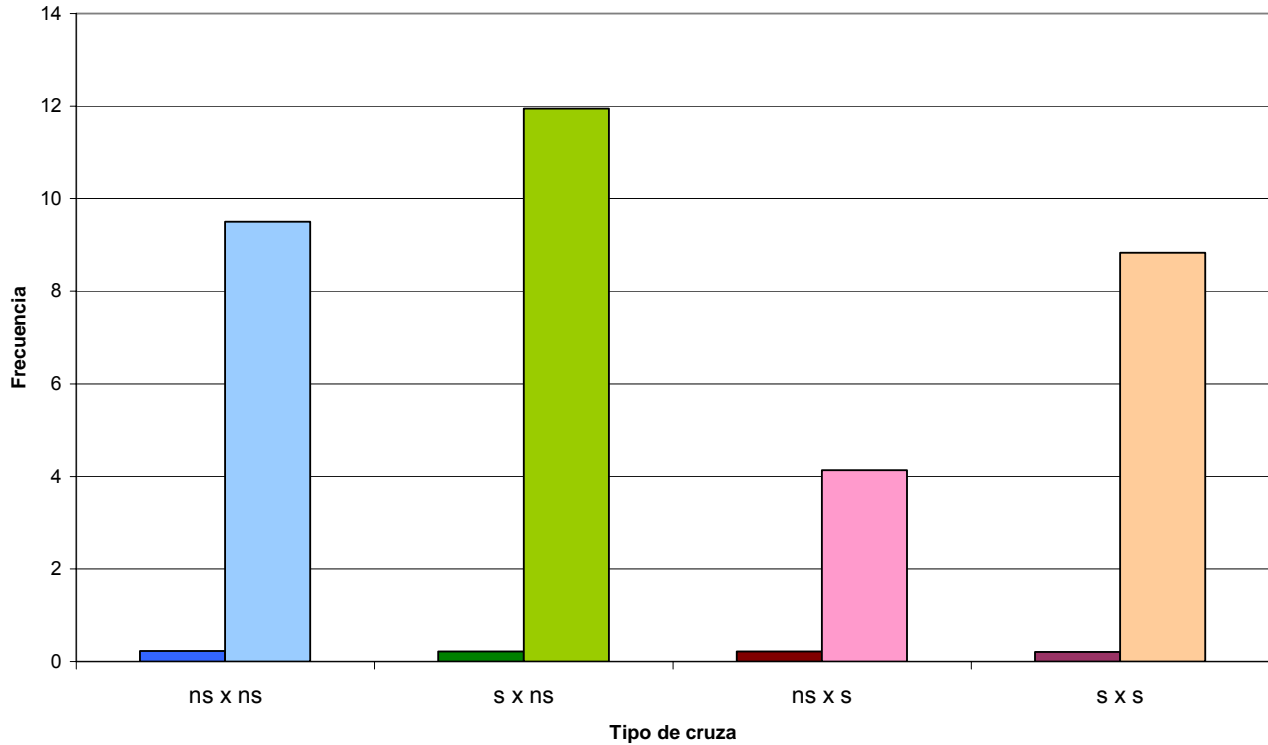
### Ensayo somático con NDMA (F<sub>47</sub>)

En la F<sub>47</sub> se realizó la misma prueba pero ahora utilizando NDMA [10 mM] (Tabla II y figura 19). La tabla II muestra la frecuencia de manchas obtenida en las cruzas testigo y expuestas a la NDMA.

Tabla II. Frecuencia de manchas inducidas con la concentración de 10 mM de la NDMA en larvas de 72 ± 4 horas de edad. Exposición: 72 X 6 horas (F <sub>47</sub> )					
Sacarosa 5%					
Cruza	Número de alas analizadas	Manchas por ala			
		Simples Chicas (1 – 2 células)	Simples Grandes (> 2 células) m = 2	Gemelas m = 5	Totales m = 2
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwh</i>	120	28 (0.23)	0 (0.0)	0 (0)	28 (0.23)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwh</i>	120	26 (0.22)	0 (0.0)	0 (0)	26 (0.22)
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwhs</i>	118	26 (0.22)	0 (0.00)	0 (0)	26 (0.22)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwhs</i>	120	24 (0.20)	1 (0.01)	0 (0)	25 (0.21)
NDMA 10 mM					
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwh</i>	120	431+ (3.59)	657 + (5.48)	52 + (0.43)	1140 + (9.50)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwh</i>	120	685 + (5.71)	689 + (5.74)	60 + (0.50)	1434 + (11.95)
<i>flr</i> <sup>3</sup> X <i>mwhs</i>	120	260 + (2.17)	202 + (1.68)	35 + (0.29)	497 + (4.14)
<i>flr</i> <sup>3</sup> s X <i>mwhs</i>	120	430 + (3.58)	501 + (4.18)	129 + (1.08)	1060 + (8.83)

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).+, positivo; w, débil positivo; i, indeterminado. P= 0.05.

**Fig. 19 Frecuencia de manchas por ala en moscas seleccionadas (s) y no seleccionadas (ns) expuestas a NDMA comparadas con el testigo [10 mM] (F47)**



La frecuencia de manchas en las progenies de los cuatro tipos de cruce se incrementó de manera significativa ( $p < 0.05$ ), de acuerdo al siguiente orden:  $s \times ns > ns \times ns = s \times s > ns \times s$ . La menor frecuencia de manchas inducidas por la NDMA se encontró en las moscas de la cruce  $ns \times s$ , siendo ésta diferente de las frecuencias del resto de las cruces tratadas ( $p < 0.05$ ). La figura 20 muestra que en las moscas no seleccionadas ( $ns \times ns$ ) hay mayor proporción de manchas grandes (que indican capacidad de proliferación de la célula después de la inducción de la lesión) que de manchas chicas (figura 20 a); en la progenie donde las hembras progenitoras o los machos progenitores han sido seleccionados ( $s \times ns$  y  $ns \times s$ ) se presentó igual proporción de manchas chicas y grandes, pero en la

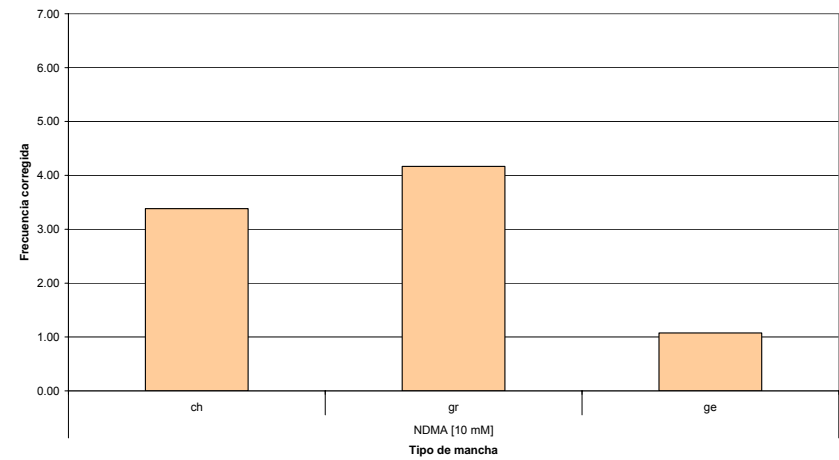
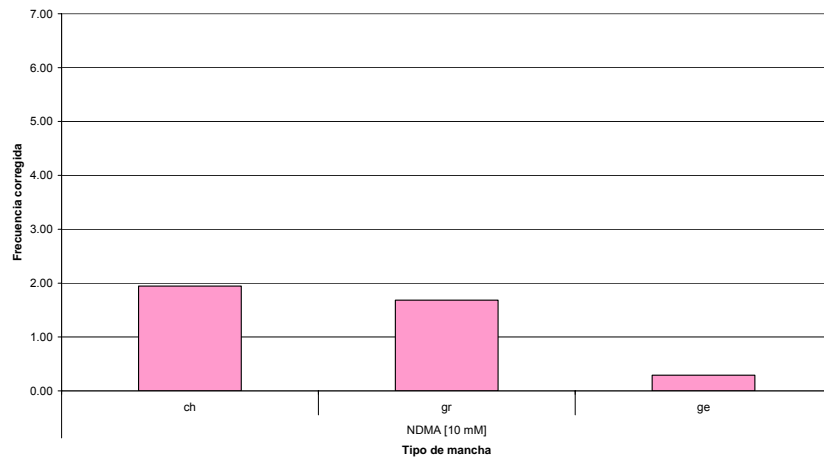
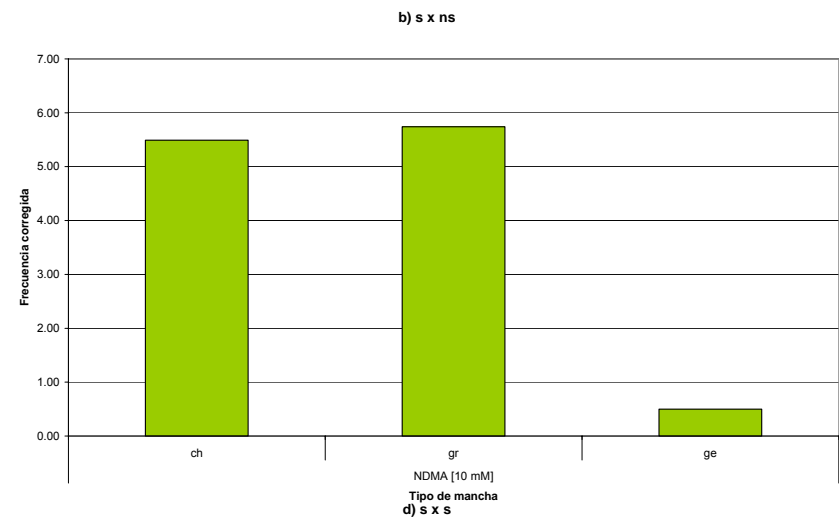
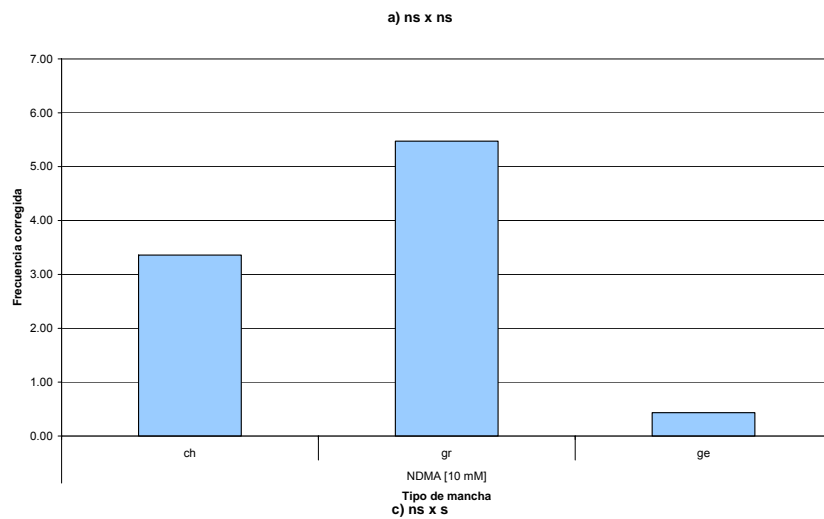
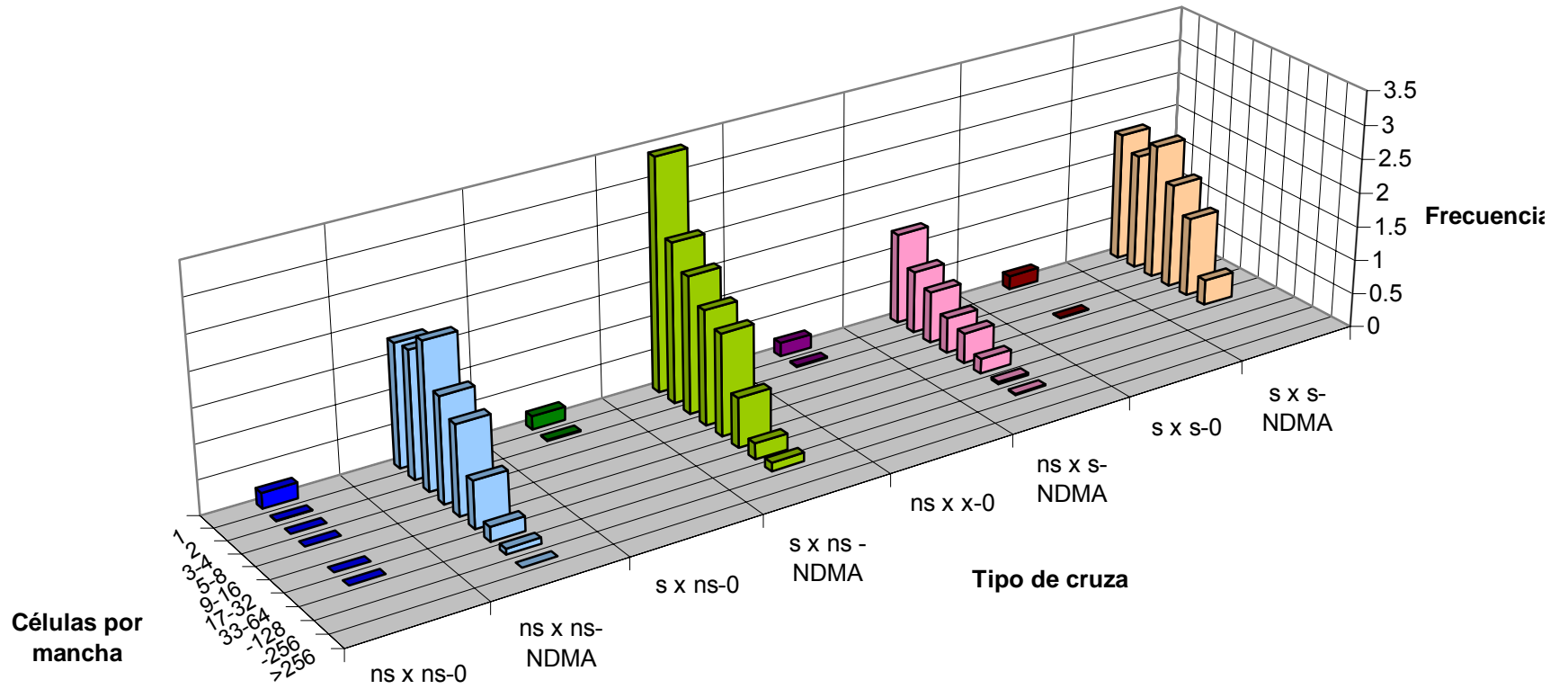
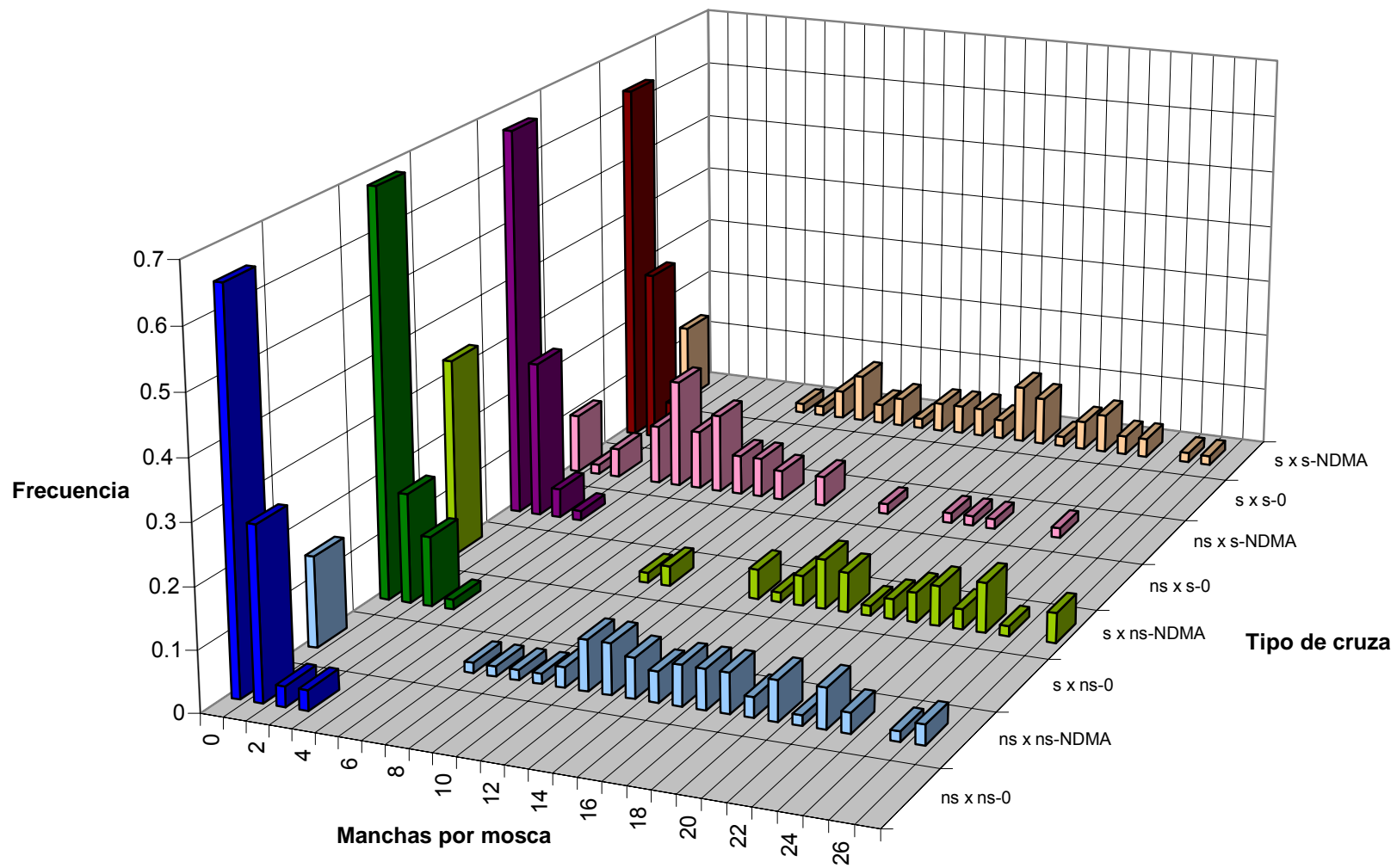


Fig. 20 Frecuencia corregida por tipo de mancha en moscas seleccionadas y no seleccionadas con  $\text{NaN}_3$  (F47) tratadas con NDMA [10 mM]

**Fig. 21 Distribución del tamaño de mancha de moscas seleccionadas y no seleccionadas tratadas con NDMA [10 mM] (F47)**



**Fig. 22 Distribución del número de manchas por mosca en moscas seleccionadas y no seleccionadas tratadas con NDMA [10 mM] (F47)**



última, la respuesta genotóxica observada fue menor (figura 20b y c); finalmente, cuando ambos progenitores han sido seleccionados se recobró un poco más de manchas grandes que de chicas, además de que en esta categoría se encontró la mayor frecuencia de manchas gemelas (figura 20 d).

La figura 21 muestra que el tamaño de mancha recobrado en las cuatro cruzas experimentales se incrementó con el tratamiento de NDMA. Se generaron manchas de hasta 256 células, con excepción de la crusa en la que ambas líneas progenitoras habían sido seleccionadas con  $\text{NaN}_3$ , en las que las manchas más grandes fueron de 32 células. Por otra parte, en la crusa donde sólo las hembras habían sido seleccionadas y en las que se obtuvo la mayor inducción de manchas (11.95), también se recobró una proporción considerable de manchas de una célula.

El tratamiento con la NDMA modificó significativamente la distribución del número de manchas por mosca en todas las cruzas con respecto a sus correspondientes testigos ( $p < 0.05$ ). En las cuatro cruzas experimentales tratadas con NDMA, se recobraron moscas con más de 20 manchas (Fig. 22). Sin embargo, en la crusa (ns x s) donde sólo los machos habían estado bajo selección con  $\text{NaN}_3$  y en la que se obtuvo la menor frecuencia de manchas, la distribución del número de manchas por mosca se ubica a la izquierda de las otras distribuciones, lo que indica que el número de manchas por mosca en estos organismos fue menor ( $p < 0.05$ ).

### **Ensayo somático con NDMA ( $F_{87}$ )**

En la  $F_{87}$ , se repitió el ensayo anterior pero utilizando una concentración menor de la NDMA [5 mM] para confirmar si las diferencias en la respuesta de genotoxicidad



detectadas entre las cruzas se mantenían a una concentración menor de este promutágeno (Tabla III y Fig. 23). Con esta concentración la frecuencia de mutación y recombinación somáticas se incrementó en forma similar en todas las cruzas experimentales tratadas con la NDMA, con respecto a sus cruzas testigo, que recibieron sacarosa al 5 %. Sólo se observó una frecuencia ligeramente mayor en las moscas de la cruza ns x s ( $p > 0.05$ ).

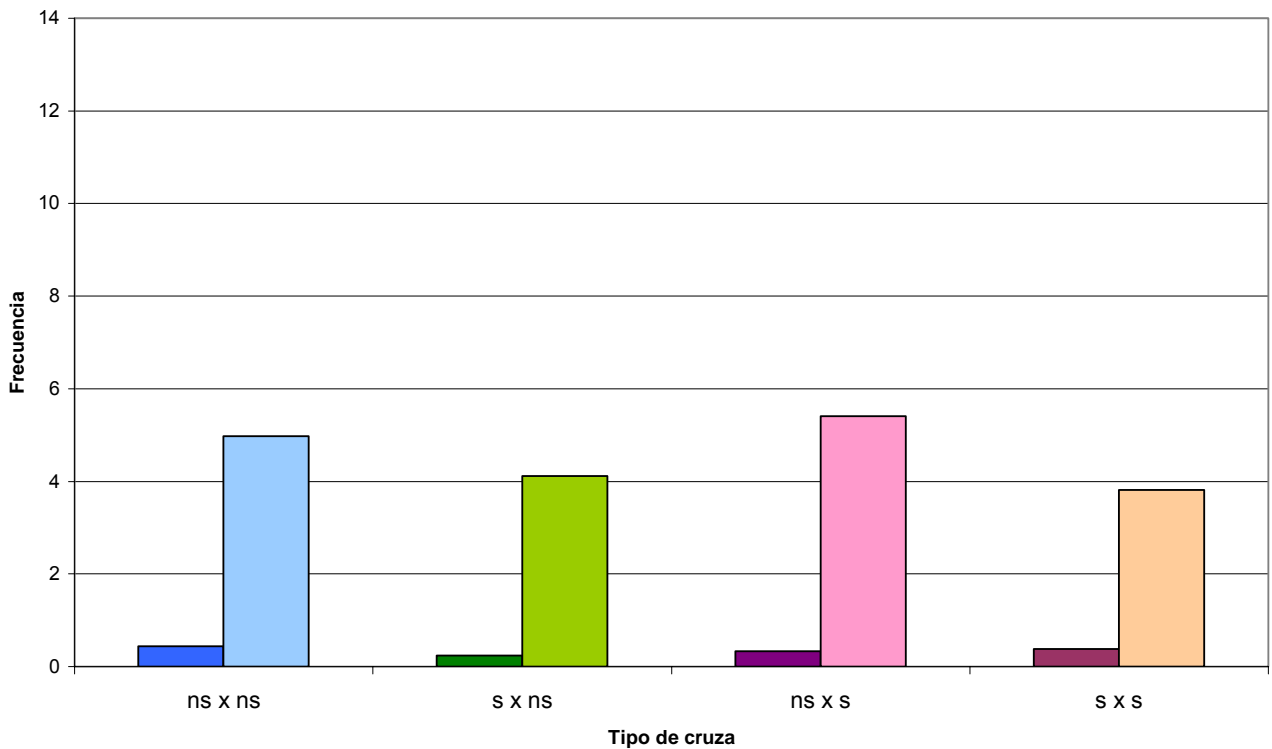
Tabla III. Frecuencia de manchas inducidas con la concentración de 5 mM de la NDMA en larvas de  $72 \pm 4$  horas de edad. Exposición: 72 X 6 horas ( $F_{87}$ )

Cruza	Número de alas analizadas	Manchas por ala			
		Simples Chicas (1 – 2 células)	Simples Grandes (> 2 células) m = 2	Gemelas m = 5	Totales m = 2
Sacarosa 5 %					
<i>flr<sup>3</sup>X mwh</i>	120	45 (0.38)	8 (0.7)	0 (0)	53 (0.44)
<i>flr<sup>3</sup>s X mwh</i>	120	27 (0.23)	2 (0.02)	0 (0)	29 (0.24)
<i>flr<sup>3</sup>X mwhs</i>	120	34 (0.28)	6 (0.05)	0 (0)	40 (0.33)
<i>flr<sup>3</sup>s X mwhs</i>	120	36 (0.30)	9 (0.08)	0 (0)	45 (0.38)

DNMA 5 mM					
<i>flr<sup>3</sup>X mwh</i>	120	238 + (1.98)	322 + (2.68)	37 + (0.31)	597 + (4.98)
<i>flr<sup>3</sup>s X mwh</i>	120	152 + (1.27)	294 + (2.45)	48 (0.40)	494 + (4.12)
<i>flr<sup>3</sup>X mwhs</i>	118	204 + (1.73)	371 + (3.14)	63 + (0.53)	638 + (5.41)
<i>flr<sup>3</sup>s X mwhs</i>	120	224 + (1.87)	193 + (1.61)	41 + (0.34)	458 + (3.82)

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).+, positivo; w, débil positivo; i, indeterminado. P= 0.05.

Fig. 23 Frecuencia de manchas por ala en moscas seleccionadas (s) y no seleccionadas (ns) expuestas a NDMA comparadas con el testigo [5 mM] (F87)



Al agrupar las manchas obtenidas por su tipo: chicas, grandes y gemelas se notó que la proporción de manchas grandes, fue ligeramente mayor en la cruce donde el macho ha sido seleccionado (ns x s) y menor cuando los dos progenitores han sido seleccionados (s x s) (Fig. 24 a - d).

La figura 25 muestra la distribución del tamaño de mancha por mosca recobrado. El tratamiento con NDMA incrementó el tamaño de mancha (manchas de hasta 256 células) en todas las series experimentales y nuevamente en la cruce donde ambas líneas progenitoras habían sido seleccionadas (s x s), se obtuvieron las manchas de menor tamaño (hasta 32 células).

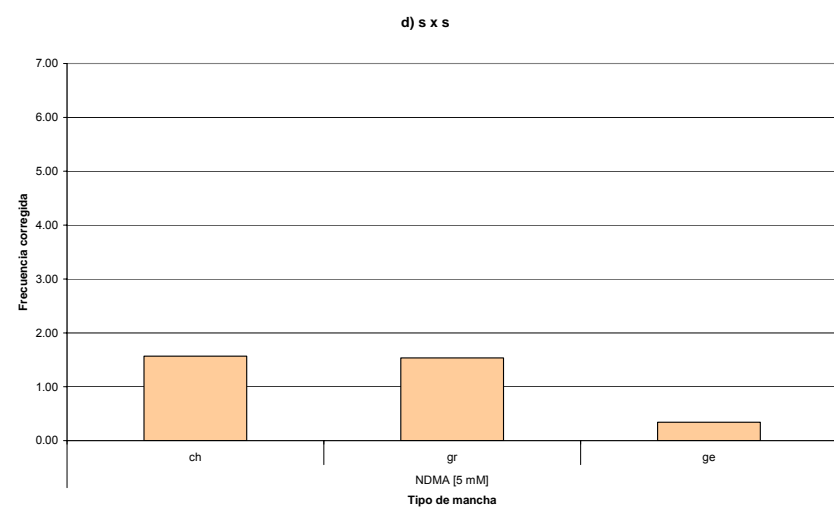
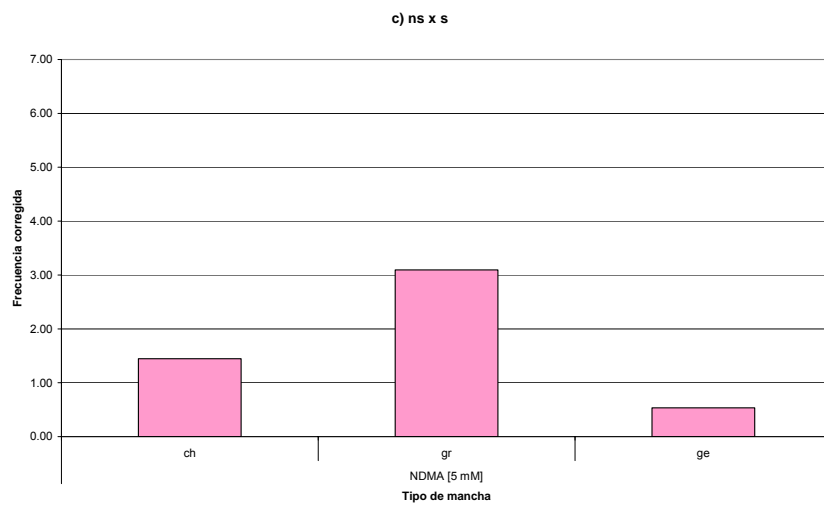
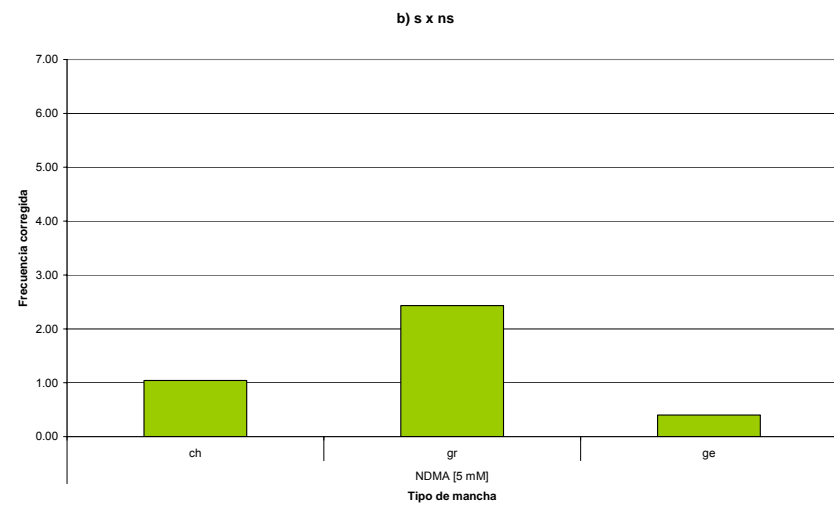
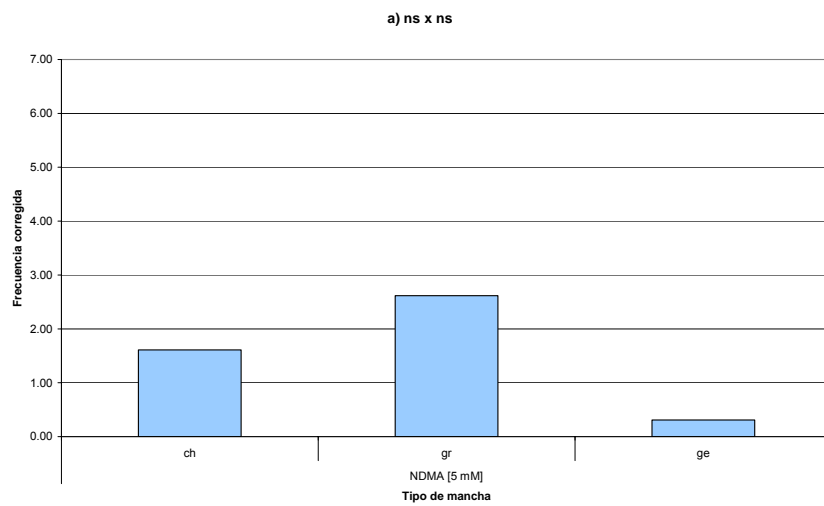
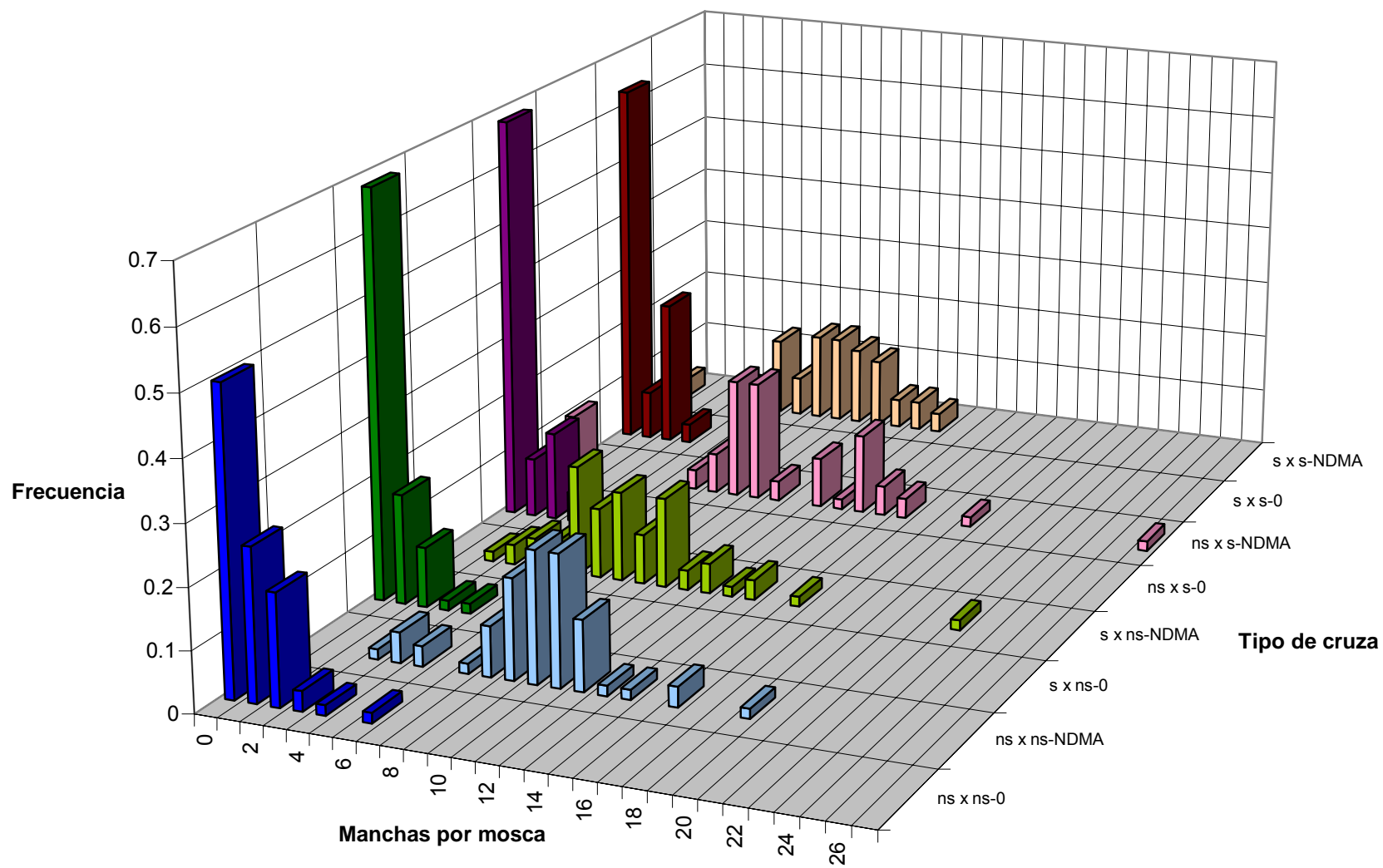


Fig. 24 Frecuencia corregida por tipo de mancha en moscas seleccionadas y no seleccionadas con  $\text{NaN}_3$  (F87) tratadas con NDMA [5 mM]

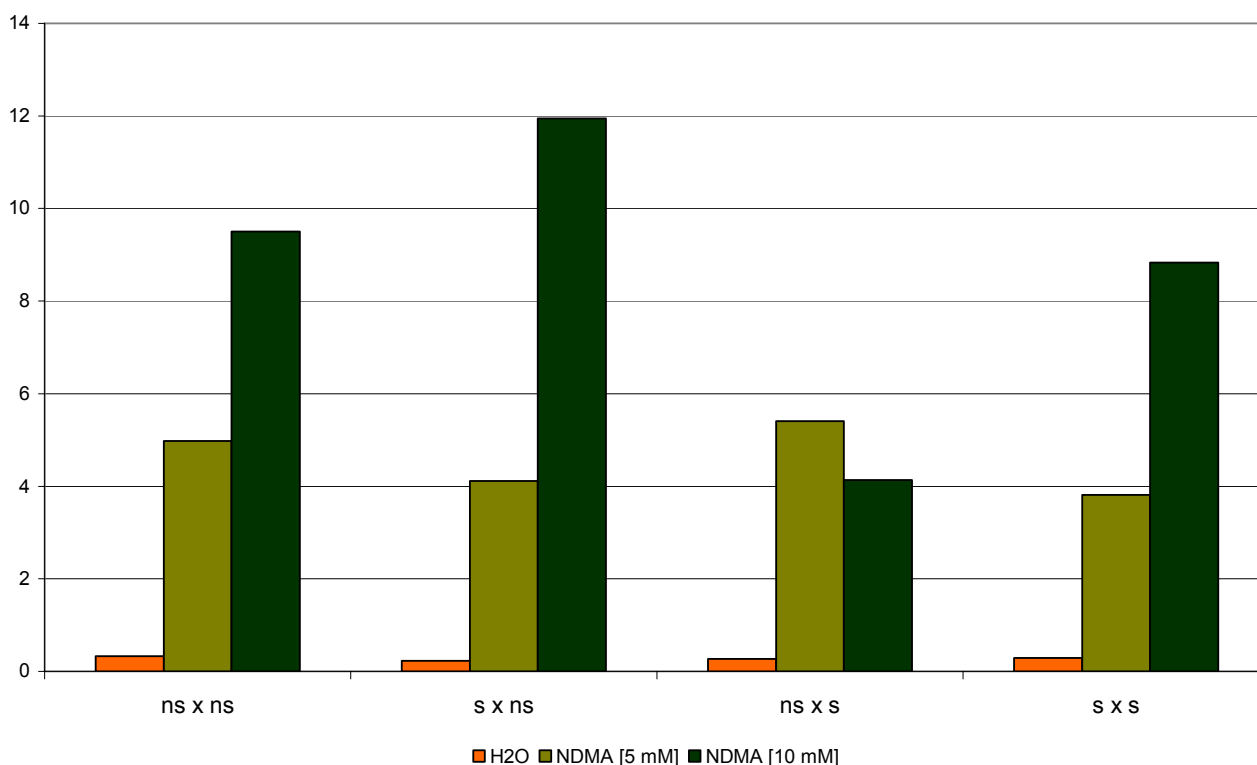


Fig. 26 Distribución del número de manchas por mosca [NDMA 5mM]



En la  $F_{87}$ , el número de manchas por mosca fue menor y más homogéneo en la progenie de la crusa  $s \times s$ , hasta 13 manchas por mosca, mientras que en las otras cruza la respuesta fue más heterogénea y se recobraron moscas con 18 manchas o más. En la crusa donde el macho o ambos progenitores habían sido seleccionados con  $\text{NaN}_3$ , se obtuvieron algunas moscas sin manchas en sus alas, a pesar de haber sido expuestas a la NDMA [5 mM] (Fig. 26).

**Fig. 27 Frecuencia de manchas por ala en moscas seleccionadas (s) y no seleccionadas (ns) expuestas a NDMA (F47 y F87)**



En la figura 27 se compara la frecuencia de manchas obtenida en el tratamiento con NDMA [10 mM] en la  $F_{47}$  de selección con  $\text{NaN}_3$  [0.04 mM] y en el tratamiento con NDMA [5 mM] en la  $F_{87}$  de selección con  $\text{NaN}_3$  [0.06 mM]. Aunque las condiciones entre los dos tratamientos son diferentes, se observa que la crusa

experimental, en la que sólo la línea de machos ha sido seleccionada, muestra una respuesta similar.

Cabe mencionar que en el primer ensayo somático en el que las moscas se retaron con  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM], en esta crusa se observó la mayor frecuencia de manchas (Fig. 15).

Por otra parte, la crusa en la que las hembras habían sido seleccionadas mostró una respuesta ligeramente mayor en el tratamiento con NDMA [10 mM] y menor en el tratamiento con  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM] (Figs. 15 y 27).

## DISCUSIÓN

La selección de organismos con base en la resistencia o sensibilidad ante algún factor de presión es una estrategia para establecer la existencia de bases genéticas que expliquen dicha respuesta.

Por sus diversas aplicaciones, la  $\text{NaN}_3$  ha sido objeto de múltiples estudios, sin embargo los reportes de investigaciones realizadas con diversos organismos y metodologías muestran gran heterogeneidad en el efecto de este compuesto. Su biotransformación al metabolito azidoalanina mediado por la OASS aportó elementos para explicar parcialmente los resultados contradictorios obtenidos en diversos sistemas. Así, este compuesto debe mostrar actividad en aquellos organismos que presenten a la OASS, ya sea como parte de su propio metabolismo o adicionada a través de fracciones microsómicas como la S9 del hígado de mamíferos. Se ha establecido la presencia de esta enzima en cebada en la que la  $\text{NaN}_3$  es claramente mutagénica (Veleminsky *et al.*, 1977; Owais *et al.*, 1978). Sin embargo, también se ha encontrado que los fluidos de seres humanos en los que también está presente, reducen la actividad de la  $\text{NaN}_3$  en cultivos bacterianos (De Flora *et al.*, 1979).

Aunque en *Drosophila melanogaster* se ha determinado la presencia de la OASS, sólo se ha reportado un ligero incremento en la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo al emplear soluciones de  $\text{NaN}_3$  con pH ligeramente ácido (Karma y Gollapudi, 1979). Sin embargo, Delgado (1990) usando la prueba de mutación y recombinación somática con la cruce: hembras *mwh/mwh* x machos *f1r<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>* reportó efecto positivo en la inducción de manchas en las alas de moscas que recibieron tratamientos agudos con  $\text{NaN}_3$  [7.3-14.7 mM]; aunque la



comparación entre el tamaño de las manchas recobradas mostró un efecto citotóxico en algunas de las concentraciones probadas. Posteriormente, González-César y Ramos-Morales (1997) en el mismo sistema y esquema de cruza aplicado en el presente trabajo, a través de una exposición semicrónica y a concentraciones menores que las probadas por Delgado (1990), mostraron que la  $\text{NaN}_3$  [0.5 - 1 mM] induce manchas por recombinación mitótica dependiente de homología ya que el efecto sólo se reportó en moscas libres de inversión y fue negativo en moscas portadoras de inversiones múltiples en las que no se recobran manchas mutantes por este mecanismo; también en ese estudio se reporta que la actividad de la azida de sodio es menor cuando se utilizan moscas que muestran altos niveles constitutivos de CYP6A2a. A través de la SMART, la actividad de la  $\text{NaN}_3$  se manifiesta *in vivo* induciendo recombinación mitótica, lo cual implica un tipo de interacción con el ADN por rompimiento y reunión de la molécula y sólo es evidente en las moscas libres de inversión en las que aumentó la frecuencia de recombinación somática de manera significativa y no tuvo efecto en las moscas portadoras del cromosoma balanceador (el cual impide recuperar eventos viables por recombinación). Estos resultados indican que la actividad de la  $\text{NaN}_3$  es principalmente recombinogénica (González-César y Ramos-Morales, 1997). En otro reporte, Ramos-Morales (2006) confirmó que en la versión de SMART de los ojos la  $\text{NaN}_3$  es dependiente de homología, ya que en las hembras que presentan dos cromosomas sexuales (**XX**) libres de inversión, induce manchas de manera significativa, mientras que en las hembras portadoras de un cromosoma balanceador y en los machos (hemicigóticos), no se observaron manchas

mutantes, pero sí pérdida de omatidias, además de disminuir el índice de sobrevivencia de los organismos tratados con el compuesto.

En otro reporte de 1999, Rivas-Martínez empleando cepas deficientes en reparación del ADN observó que las moscas portadoras de inversiones múltiples en el cromosoma **X**, eficientes en reparación de daño al ADN alimentadas semicrónicamente con  $\text{NaN}_3$  [0.06 – 1 mM] presentaron índices de sobrevivencia tan bajos como los de las moscas deficientes en reparación, lo que mostró, que en este sistema, la  $\text{NaN}_3$  o más propiamente el metabolito azidoalanina sí interactúa directamente con el ADN e induce lesiones que se reparan por recombinación. La no homología entre los cromosomas **XX** de estas cepas explica la disminución del índice de sobrevivencia de las moscas tratadas.

En *Drosophila* se ha identificado la activación al metabolito vía la enzima OASS y actualmente se dispone de reportes en los que se ha evidenciado actividad genotóxica para este compuesto en este sistema (Sadiq y Owais, 2000). Por otra parte, se ha propuesto que el metabolito azidoalanina puede sufrir modificaciones adicionales mediadas por enzimas dependientes de CYP450 (La Velle y Mangold, 1987). En la cepa bacteriana TA100 de *S. typhimurium*, el bloqueo del grupo amino en la molécula de la azidoalanina reduce marcadamente el potencial mutagénico de ésta, lo que sugiere que se requiere de la forma libre del grupo amino para la actividad mutagénica y se ha sugerido que este paso podría estar mediado por activación enzimática (La Velle y Mangold, 1987).

Se ha mostrado que en *Drosophila* los elementos transponibles pueden estar involucrados en los eventos iniciales que producen rearrreglos cromosómicos como translocaciones, inversiones y deleciones. Estos rearrreglos pueden afectar el

patrón de expresión de los genes o en su caso, la herencia de grupos completos de genes, lo que llevaría a modificar los niveles constitutivos de las enzimas que participan en la biotransformación de sustancias genotóxicas (Engels y Preston, 1979; Darbon *et al.*, 2002; Kidwell, 1983; Gilbert, 2004).

Los resultados obtenidos en la presente tesis aportan elementos a favor de una base genética para la resistencia a la exposición a la  $\text{NaN}_3$ , como es el incremento en la tolerancia que se ha logrado en las cepas seleccionadas, de 0.001 mM en la  $F_1$  y 0.1 mM, para la  $F_{161}$ , lo que implica un aumento de 100 veces en la concentración de  $\text{NaN}_3$  a partir del inicio de la exposición crónica al compuesto. La resistencia alcanzada por los organismos ha sido gradual debido a que se requiere tiempo para que las moscas sometidas al estrés químico que ejerce la exposición a la  $\text{NaN}_3$ , se adapten a la concentración administrada del compuesto, es decir, las moscas seleccionadas deben mantener su capacidad reproductiva. Así, comparada con la población original, la proporción de organismos resistentes es cada vez mayor.

Para evaluar el efecto que la selección confiere a las moscas expuestas a la  $\text{NaN}_3$  por exposición crónica, se diseñó una estrategia en la que se comparó la respuesta de genotoxicidad entre cruza, empleando moscas cultivadas en presencia de este compuesto (seleccionadas, s) y moscas testigo (no seleccionadas, ns): s x s vs ns x ns; adicionalmente se realizaron cruza en las que sólo una de las líneas progenitoras había sido seleccionada: s x ns y ns x s.

La primera evaluación del efecto de la selección se realizó utilizando al mismo compuesto  $\text{NaN}_3$ , en una concentración mayor pero en una exposición semicrónica. No se encontraron diferencias entre la actividad genotóxica obtenida

en las moscas de cada cruce de los respectivos lotes testigo (sin compuesto), sin embargo, en las moscas seleccionadas y no seleccionadas tratadas con el compuesto se observó diferencia en la actividad ya que las moscas donde los dos progenitores han estado bajo selección, se recobraron manchas de mayor tamaño. Este aspecto es importante porque las manchas grandes implican que la célula que sufrió la lesión logró repararla y mantuvo su capacidad proliferativa, generando una mancha mutante grande. Por otra parte, la respuesta obtenida con este compuesto indica que la selección ha favorecido la capacidad de activación de la  $\text{NaN}_3$ , pero no necesariamente una mayor capacidad de desintoxicación, por lo que elementos adicionales podrían estar involucrados en ésta, como reportaron González- César y Ramos-Morales (1997) en líneas de moscas resistentes a insecticidas (ORR) en las que el efecto de la  $\text{NaN}_3$  es menor, comparado con las cepas estándar.

Al progresar la selección (0.04 mM para la  $F_{47}$ ) se contrastó la respuesta ante un promutágeno que requiere ser biotransformado (NDMA). Las moscas con progenitores seleccionados mostraron manchas que se formaron a través de más de dos ciclos celulares. En la cruce donde sólo los machos han sido seleccionados se recuperaron moscas con menor número de manchas cuando se trataron con la NDMA a 10 mM. Al continuar la selección (0.06 mM para la  $F_{87}$ ) y retar a las moscas con una concentración menor de NDMA [5 mM], la mayor actividad se presentó en esta cruce (ns x s). Sin embargo, al comparar la respuesta obtenida en los dos tratamientos con NDMA, la frecuencia de manchas por ala en la prole de esta cruce es muy similar. En el resto de las cruces empleadas, el

aumento en la frecuencia de manchas por ala está relacionado con la concentración.

Si bien los tratamientos con  $\text{NaN}_3$  y NDMA se realizaron en generaciones diferentes, los resultados obtenidos apoyan la propuesta de que la resistencia a la  $\text{NaN}_3$  tiene una base genética. Esta resistencia se manifiesta además en una capacidad metabólica diferencial hacia el promutágeno NDMA. Se ha reportado que la administración de  $\text{NaN}_3$ , un atrapador de radicales de oxígeno exitado, reduce el efecto de algunas nitrosaminas que se caracterizan por inducir la formación de especies reactivas de oxígeno como parte de su biotransformación, pero no de compuestos de acción directa como el metil metanosulfonato (Gichner y Velemnisky, 1988), lo que sugiere que en la actividad de las nitrosaminas y de la  $\text{NaN}_3$  podrían haber elementos comunes, como algunos citocromos que han sido asociados con la biotransformación de nitrosaminas y aminas aromáticas:

Familia/ subfamilia	Sustrato	Reacción catalizada	Especie	Referencia
CYP2E1 CYP2a4 CYP2a5 CYP2B1 CYP6A2	NDMA	Hidroxilación	Humano	Rodríguez-Arnaíz <i>et al.</i> , 1993 Maitra <i>et al.</i> , 2000 Estabrook, 1996
CYP2a5 CYP2A6 CYP2E1 CYP2B1	Isoniazida	Acetilación N-metilación	Rata  Humano	Islas-Guzmán, 1996 Estabrook, 1996
CYP2E1 CYP2B1	Procarbazina (Pirazinamida)	Acetilación	Humano	Islas-Guzmán, 1996 Estabrook, 1996
CYP2B1 CYP6A2a CYP2E1	Aminas ( $\text{NaN}_3$ )	Hidroxilación Desaminación	<i>D. melanogaster</i>	Ramos-Morales, 2006

La comparación entre los resultados obtenidos en el presente trabajo y los reportados para *Drosophila* utilizando metodologías similares sugiere que probablemente algunas actividades enzimáticas relacionadas con la biotransformación y desintoxicación de la  $\text{NaN}_3$  (azidoalanina) y la NDMA podrían tener elementos comunes.

El efecto de la continua selección de las moscas con la azida de sodio parece modificar ligeramente la respuesta de genotoxicidad, como se aprecia al comparar la respuesta obtenida en los tratamientos con  $\text{NaN}_3$  [0.75 mM] y la NDMA con las cruzas ns x ns y s x s, sin embargo, los resultados logrados en las cruzas donde sólo uno de los progenitores ha sido seleccionado muestran que el efecto de la selección impacta de diferente manera a la línea de hembras (*flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*) y a la línea de machos (*mwh/mwh*). Una posibilidad que es necesario explorar es la actividad de las enzimas asociadas con la biotransformación de la NDMA, ya que, como se ha mostrado en otros estudios, las moscas que tienen la capacidad de biotransformar más eficientemente a la NDMA tienen una actividad más débil cuando son expuestas a la  $\text{NaN}_3$ , que la de las moscas con metabolismo estándar. La transformación enzimática adicional del metabolito azidoalanina ha sido propuesta por La Velle y Mongold (1987) al comparar la genotoxicidad de análogos de este compuesto en *Salmonella*.

Respuesta de genotoxicidad de la azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) y de la NDMA en cepas de *D. melanogaster* (González-César y Ramos-Morales, 1997)

Cepa	Compuesto	
	NaN <sub>3</sub>	NDMA
Estándar	+	+
<i>ORR/OR; flr3/In(3LR)TM3, ri<sup>p</sup>se l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> Bd<sup>S</sup> x mwh/mwh</i>	-	++

Efecto genotóxico obtenido en las cruza experimentales (b – d) comparado con el obtenido en la cruza con moscas no seleccionadas (a)

♀♀ <i>flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup></i> x ♂♂ <i>mwh/mwh</i>	[0.75 mM]	5 mM	10 mM
a) ns x ns	+	+	+
b) s x ns	+, ↓	+	+
c) ns x s	+	+	+↓
d) s x s	+	+, ↓	+

+ = efecto genotóxico: moscas expuestas al compuesto vs tratadas con el disolvente

↓, actividad recobrada en la cruza experimental vs la actividad de la cruza no seleccionada

Otro aspecto interesante que confirma el efecto de la selección es la distribución del daño en los organismos derivados de cada cruza. En los tratamientos con NDMA se recobran moscas con mayor variabilidad en el número de manchas por mosca en la cruza con moscas no seleccionadas (ns x ns), mientras que cuando ambos progenitores son seleccionados, la respuesta se reparte entre los individuos (Fig. 26) de manera más homogénea.

Se requiere profundizar en la caracterización enzimática de las cepas utilizadas en este estudio y establecer si el efecto de la selección ha favorecido a organismos con una actividad metabólica diferencial para la activación o bien para la

desintoxicación de genotóxicos, lo cual a su vez podría tener diversas implicaciones como: acelerar o retardar la disponibilidad de un agente genotóxico en el organismo o más particularmente, en el sitio de actividad; modificar la vida media de los compuestos, ya sea acortando o retardando su eliminación y excreción o bien, afectar de manera indirecta a otros procesos dependientes de actividad enzimática como por ejemplo, la reparación de lesiones al DNA.



## CONCLUSIONES

1. En *Drosophila melanogaster* la tolerancia a la  $\text{NaN}_3$  tiene una base heredable.
2. Las moscas seleccionadas muestran capacidad para activar a la azida de sodio.
3. La selección de las dos líneas de moscas progenitoras produce progenie que estabiliza eficientemente lesiones inducidas por la  $\text{NaN}_3$ .
4. Las moscas seleccionadas responden de manera diferencial ante la exposición al promutágeno NDMA.
5. La actividad genotóxica inducida por la NDMA es más homogénea en las moscas donde ambos progenitores han sido seleccionados.
6. *Drosophila melanogaster* es un sistema *in vivo* que permite analizar el efecto heredable de la selección a largo plazo.

## REFERENCIAS

Adams M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. C. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeifer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helft, C. R. Nelson, G. L. Gabor Miklos, J. F. Abril, A. Agbayani, H. An, C. Andrews-Pfannkoch, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. D. Davenport, P. Davies, B. de Pabos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferreira, W. Fleischmann, C. Fosler, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G. H. Karpen, Z. Ke, J. A. Kennison, K. A. Ketchum, B. E. Kimmel, C. D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. Mcleod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S. M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D. M. Muzny, D. L. Nelson, D. R. Nelson, K. A. Nelson, K. Nixon, D. R. Nusskern, J. M. Pacleb, M. Palazzolo, G. S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. C. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Sidén-Kiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A. C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A. H. Wang, X. Wang, Z. Wang, D. A. Wassarman, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, T. Woodage, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R. Ye, J. S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X. H. Zheng, F. N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H. O. Smith, R. A. Gibbs, E. W. Myers, G. M. Rubin, y J. C. Venter (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.

Albert L. A. (1988) Curso básico de toxicología ambiental, Limusa, México, 311 p.

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

Baars A. J., G. H. Blijleven, G. R. Mohn, A.T. Natarajan y D. D. Brüner (1980) Preliminary studies on the ability of *Drosophila melanogaster* preparations to active mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 72: 257-264.

Bac Z. M. (1971) Fundamentals of biochemical pharmacology. Pergamon Press. N. Y. 420 p.

Berndt J. D., L. C. Narriman y F. González-Lima (2001) Effects of chronic sodium azide on brain and muscle cytochrome oxidase activity: A potential model to investigate environmental contributions to neurodegenerative diseases. *J. Toxicol. Environ. Health* 63: 67-77.

Berrada S. y D. Fournier (1997) Transposition-mediated transcriptional overexpression as a mechanism of insecticide resistance. *Mol. Gen. Genetic* 256:348-54.

Berrigan D, M. Hercus, H. Dagher y A. A. Hoffmann (1997) Comparing different measures of heat resistance in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 43: 393-405.

Betterton E. (2003) Environmental fate of sodium azide derived from automobile airbags. *Critical Rev. Environ. Sc. Technol.* 33: 423-458.

Beyer H. y W. Walter (1987) *Manual de Química Orgánica*. Reverté, S.A. México. 1080 p.

Bolt H. M., P. H. Roos y R. Their (2003) The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. In. *Arch. Occup. Environ. Health* 76: 174-185.

Bommarus A. S. y K. M. Polizzi (2006) Novel Biocatalysts: Recent developments. *Chem. Engin. Sci.* 61: 1004-1016.

Bonner E., E. Cahoon, S. Knapke y J. Je (2005) Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: Structural and functional analysis of O-acetylserine Sulfhydrylase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 280:38803-38813.

Bourguet D., M. Prout y M. Raymond (1996) Dominance of insecticide resistance a presents plastic response. *Genetics* 143: 407-416.

Braun, R. H., H-P. Jäkel y J. Schöneich. (1997) Genetic effects of isoniazid and the relationship to *in vivo* and *in vitro* biotransformation. *Mutat. Res.* 137: 61-69.

Brusick E. W. (1975) *Principles of Genetic Toxicology*. 2a. ed. Plenum Press Nueva York, 204 p.

Cakir S. y R. Sarikaya. (2005) Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food Chem. Toxicol.* 43: 443-450

Capdevila J. H., D. Zeldin, K. Makita, A. Karara y J. R. Falck (1995) Cytochrome P450 and metabolism of arachidonic acid and oxygenated eicosanoids. En *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry*. P. R. Ortiz de Montellano (ed.) Plenum Press. New York 443-471 p.

Cariño F. A., J. F. Koener, F. W. Plapp y R. Feyereisen (1994) Constitutive over-expression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a housefly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 411-18.

Caro A. A. y A. I. Cederbaum (2005) Inhibition of CYP2E1 catalytic activity in vitro by S-adenosyl-L-methionine. *Biochem. Pharmacol.* 69: 1081-1093.

Cassaret L. J. y M. D. J. Doull Eds. (1975) *Toxicology. The basic science of poisons.* MacMillan Publishingh, Londres. Pp. 11-133.

Chang T. K. H. y D. J. Waxman (1996) The CYP2A subfamily. En: *Cytochromes P450: Metabolic and toxicological aspects.* (Costas Ioannides ed.) CRC Boca raton New York 3-54 p.

Clark A. M. (1985) The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutat. Res.* 2: 89-97.

Clements J., D. M. Howe, Phillips y N. K. Todd (1988) The *Drosophila* wing test: a comparison to the sensitivity of different strains. *Mutat. Res.* 203: 117-123.

Conger B. V. y 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. *Mutat. Res.* 66: 301-305.

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

Crick F. C. H. y P. A. Lawrence (1975) Compartments and polyclones in insect development. *Science* 189: 340-347.

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

Darbon P. J., J. L. Yen, M. R. Bogwitz, G. Le Goff, E. Feil, S. Jeffers, N. Tijet, T. Perry, D. Heckel, P. Batterham, R. Feyereisen, T. G. Wilson y R. H. French-Constant (2002) A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256.

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

De Serres F. J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicator of environmental mutagens and carcinogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 84:75-84.

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 p.

Demerec M. (1965) *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Co. Nueva York 632 p.

Devonshire A. L y L. M. Field (1991) Gene amplification and insecticide resistance *Annu. Rev. Entomol.* 36:1-23.

Dotson S. B y D. A. Somers (1989) Differential metabolism of sodium azide in maize callus and germinating embryos. *Mutat. Res.* 213: 157-63.

Dunkov B., R. Rodríguez-Arnaíz., B. Pittendrigh, R. ffrench-Constant y R. Feyereisen (1996): Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genetics* 251: 290-297.

Enayati A. A., H. Ranson y J. Hemingway (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14:3-8.

Engels W. R. y C. R. Preston (1979) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. The biology of female and male sterility. *Genetics* 92: 161-174.

Engvild K. C. (2005) Mutagenesis of the Model Grass *Brachypodium distachyon* with Sodium Azide. Riso National Laboratory Information Service Department P.O. Box 49. DK-4000 Roskilde. Denmark 1-9 p.

Estabrook R. W. (1996) Cytochrome P450: From a single protein to a family of proteins with some personal reflections. En: *Cytochromes P450: Metabolic and toxicological aspects.* (Costas Ioannides ed.) CRC Boca raton New York p 3-54.

Feyereisen R. (1993) Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genetics* 251 : 290-297

Feyereisen R. (1999) Insect P450 enzymes. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 507-533.

Franciosa H. y J. B. Berge (1995) Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-2 families. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 311-317.

ffrench-Constant R. H. (1994) The molecular and population genetics of ciclodiene insecticida resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24:335-45.

ffrench-Constant R. H. (1999) Target site mediated insecticida resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:397:403.

ffrench-Constant R. H., J. Phillip, Daborn y Le Goff (2004) The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Gennetics* 20: 163-170.

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

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

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

Gilbert I. L. (2004) Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215: 1-10.

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

Golic K. G. (1991) Site specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* 252: 958-961.

González-César (1994) Efecto del metabolismo en la respuesta genotóxica de azida de sodio en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM 60 p.

González-César E. y P. Ramos-Morlales (1997) Soium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* larvae. *Mutat. Res.* 389:157-165.

González F. J., S. Y. Lui y M. Yano. (1993) Regulation of P450 genes – molecular mechanisms. *Pharmacogenetics* 3: 51-57.

Goodman G. A., W. T. Rall, S. A. Nies y P. Taylor (1990) The pharmacological basis of therapeutics. Panamericana 1811 p.

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

Graf U., H. Juon, A. J. Katz, H. J. Frei y F. F. Würgler (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120: 233-239.

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

Graf U. y F. E. Würgler (1988) Ther sex-linked recessive lethal assay and recombination test in *Drosophila melanogaster*. En: Evaluation of short term tests for

carcinogens (J. Ashby *et al.* eds). Cambridge UK-WHO/Cambridge University Press. Vol. 2. Pp 2301-2309.

Graf U., N. Van Schaik y R. Pacella (1991a) Improved "High Bioactivation" cross for the SMART wing assay. *DIS* 70: 247-248.

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

Grant D. F. y B. D. Hammock (1992) Genetic and molecular evidence for a *trans*-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol. Gen. Genet.* 234: 169-176.

Grant W. F. y M. F. Salamone (1994) Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310: 187-209.

Guzmán-Rincon J, J. Espinosa y U. Graf (1998) Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 412(1): 69-81

Hällstrom I, J. Magnusson y C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and genetically determined variation in the level induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 92: 61-168.

Hällstrom I. (1984) Cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*, activity, genetic variation and regulation. Ph. D. Thesis, Stockholm 350 p.

Hällstrom I., A. Blanck y S. Atuma (1984) Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Chem. Pharmacol.* 33: 13-20.

Hällstrom I. (1985) Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster* II. Localization of some genes regulation cytochromes P-450 activity. *Chem. Biol. Interact.* 56: 172-184

Helvig C., N. R. Tijet, F. Feyereisen, A. Walker y L. Restifo (2004) *Drosophila melanogaster* CYP6A8, an insect P450 that catalyzes lauric acid (*w*-1)-hydroxylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 325: 1495-1502.

Hernández-Aranda 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 p.

Herrera- Bazán J. J. H. (2005) Efecto de concentraciones bajas de talidomida en la fertilidad de moscas (*Drosophila melanogaster*) expuestas durante el desarrollo larvario. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 92 p.

Herrero S., B. Opper y J. Ferré (2001) Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1085-1089.

Index Merck (1989) Encyclopedia of chemical drugs. Published by Merck and Co; Inc. Rahway. Nueva York 1606 p.

Islas-Guzmán M. de J. (1996) Comparación de la actividad genotóxica de tres compuestos del grupo de las azidas en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM 83 p.

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

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

Kanaya N., B. S. Gil, I. S. Grover, A. Murin, R. Osiecka, S. S. Sandhu y H. C. Anderson (1994) *Vicia faba* chromosomal aberration assay. Mutat. Res. 310: 231-247.

Kidwell M. G. (1983) Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:1655-1659.

Klaassen C. D. (1975) Absorption, distribution and excretion of toxicants. En: Toxicology, the basic science of poisons. (L. J. Casarett y J. Doull ed.) Macmillan Pub. Nueva York. Co. 26-44 p.

Kleinhofs A., M. Kleinschmidt, D. Sciak y S. von Broembsen (1975) Azide mutagenesis. *In vitro* studies. Mutat. Res. 29: 497-500.

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

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

Klug W. S. y M. R. Cummings (1999) Conceptos de Genética. Prentice Hall. 814 p.

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

Lagadic L. A., A. Cuany, J. B. Bergé y M. Echaubard (1993) Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from insecticide-resistant and



lindane-induced susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. Insect Biochem. Mol. Biol. 23: 467-474.

Le Goff G., F. Hilliou, D. Blair, D. Siegfried, S. Boundy, E. Wajnberg, L. sofer, P. Audant, R. H. frrendch-Constant y R. Feyereisen (2006) Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*. Sex dependence of P450 and GST gene induction. Insect Biochem. and Mol. Biol. 36: 674-682.

Leary S., H. Bruce, L. Carrie, C. Christopher, M. Denise, K. Claudia, D. Kenton, G. Moira y M. Christopher (2002) Chronic Treatment with azide *in situ* leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation. J. Biol. Chem. 277: 11321-11328.

Lewis E. B. (2004) Developmental genetics of *Drosophila*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1038: 94-97.

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

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

Lindsley, D. L. y G. Zimm (eds.) (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego, CA. 1133 p.

Lippmann Ph. D. (1992) Environmental toxicants human exposures and their health effects. Van Nostrand Reinhold. New York 699 p.

Ma T. H., R. Cabrera, B. S. Chen, S. S. Gill, A. L. Sandhu, M. F. Vandenber y M. F. Salome (1994) *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. Mutat. Res. 310: 221-230.

Maitra S., M. D. Dombrowski, M. Basu, O. Raustol, L. C. Waters y R. Ganguly (2000) Factors on the third chromosome affect the level of *Cyp6a2* and *Cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. Gene 248: 147-156.

Maldonado L. J. (1994) Comparación entre la estructura química y la actividad mutagénica de cinco compuestos orgánicos en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM 60 p.

Manahan S. E. (1991) Environmental Chemistry, Willard Grant Press, 4a. ed. Boston 506-508 p.

McKenzie J. A. (1993) Measuring fitness and intergenic interactios: the evolution of resistance to diazinon in *Lucilia cuprina*. Genetica 90: 227-37.

McKenzie J. A. (1994) The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends Ecol. Evol.* 9: 166-169.

McKenzie J. A. (1996) Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. Austin, TX: Landes. 185 p.

Nicholls, D. y S. J. Ferguson (1992) *Bioenergetics 2*. Academic Press Inc. San Diego, CA 92101. 255 p.

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

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

Ohkama-Ohtsu N., I. Kasajima, T. Fujiwara y S. Naito (2004) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant that overaccumulates O-acetyl-L-Ser. *Plant Physiol.* 136: 3209-3222.

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

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

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

Owais W. M. y R. Gharaibeh (1990) Cloning of the *E. coli* O-acetylserine sulfhydrylase gene: ability of the clone to produce a mutagenic product from azide and O-acetylserine. *Mutat. Res.* 245: 151-155-

Pearson M. J. (1974) The abdominal epidermis of *Calliphora erythrocephala* (Diptera) and polyteny and growth in the larval cells. *J. Cell Sci.* 16: 113-131.

Peña E., E. Carte y F. Ayala-Fierro (2001) *Toxicología Ambiental: Evaluación de riesgos y restauración ambiental*. The University of Arizona. 203 p.

Pomerai D. D. (1990) *From gene to animal: An introduction to the molecular development*. Cambridge the University Press. 2 ed. Nueva York 417 p.

Rabeh W. M., S. S. Alguindigue y P. F. Cook (2005) Mechanism of the addition half of the O-acetylserine sulfhydrylase-A reaction. *Biochemical* 44: 5541-5550.

Ramos-Morales. P., H. M. Abundis, J. C. Gaytán, M. G. Ordaz, P. G. Orozco, J. Maldonado, H. Hernández, E. González, P. Reyes, E. M. Galicia y J. A. Muñoz

(1993) Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill. México, 131 p.

Ramos-Morales. P. y R. Rodríguez-Arnaiz (1995) Genotoxicity of two arsenic compounds in germ cells and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Env. Mol. Mutat.* 25: 288-299.

Ramos-Morales. P. y Ordaz-Téllez M. G. (2006) Sodium azide genotoxicity: *Drosophila's* differences?. En prensa.

Rivas-Martínez H. (1999) Participación de la reparación en el daño inducido por mutágenos con diferente actividad química: N-nitrosodimetilamina (DMN), Metilmetanosulfonato (MMS), Colchicina, Azida de Sodio y Cloruro de Plomo, Tesis Biólogo, ENEP-Iztacala, UNAM, 61 p.

Rodríguez-Arnaiz (2003) *Drosophila* como organismo modelo en la biología experimental. En: Jiménez L. F. y H. Merchant (2003) *Biología celular y molecular*. Prentice Hall. 853 p.

Rodríguez-Arnaiz R. y P. Ramos-Morales (1992) *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Serie los pequeños manuales, Facultad de Ciencias, UNAM.

Rodríguez-Arnaiz R, E .W. Vogel y A. Szakmary (1993) Strong intraespecific variability in the metabolic conversion of six procarcinogens to somatic cell recombinogens in *Drosophila*. *Mutagenesis* 8: 543-551.

Roseland C. R. y H. A. Schneiderman (1979) Regulation and metamorphosis of the abdominal histoblast of *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* 186:235-265.

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

Russell P. J. (1998) *Genetics*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 805 p.

Sadiq M. F. y W. M. Owais (2000) Mutagenicity of sodium azide and its metabolite azidoalanine in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 469: 253-257.

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

Saner C., B. Weibel, F. F. Wurgler y C. Sergstag (1996) Metabolism of promutagens catalized by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. Environ Mol. Mutagen. 27: 46-58.

Scott J. G. (1995) The molecular genetics of resistance: Resistance as a response to stress. *Symposium on pesticide Resistance* Florida Entomologist 78(3).

Scott J. G., N. Liu y Z. Wen (1998) Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. Comparative Biochem. Physiol. 121: 147-155.

Scott J. G., N. Liu y Z. Wen (2001) Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg<sup>†</sup>. Pest Manag. Sci. 57:958-967.

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

Siddique H., S. Chowdhuri y A. Dhawan (2005). Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. Mutagenesis 20: 285-290.

Smith R. P. y D. E. Wilcox (1994) Toxicology of selected nitric oxide-donating xenobiotics, with particular reference to azide. Crit. Rev. Toxicol. 24: 355-377.

Sobels P. H. y E. Vogel (1976) The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage. Mutat. Res. 41: 95-106.

Stryer L. (1995) Bioquímica. Reverté. Barcelona, España.

Tamarin R. H. (1982) Principles of genetics, Willard Grant Press, Boston, 207-209 p.

Timbrell J. A. (1989) Introduction to toxicology. Taylor & Francis Ltd. USA 155 p.

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

Undseth S. S., C. E. Nix y L. C. Waters (1990) Isolation of insecticide resistance related forms of cytochrome P-450 from *Drosophila melanogaster*. Biochem. J. 265:213-17.

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

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

Vermeulen N. P. E. (1996) Role of metabolism in chemical toxicity. En: *Cytochromes P450: Metabolic and toxicological aspects.* (Costas Ioannides ed.) CRC Boca raton New York 3-54 p.

Verna L. K., D. Chen, G. Schluter y G. M. Williams (1998) Inhibition by singlet oxygen quenchers of oxidative damage to DNA produced in culture cells by exposure to a quinolona antibiotic and ultraviolet a irradiation. *Cell Biol. Toxicol.* 14: 237-242.

Vogel E., H. Frei, K. Fujikawa, U. Graf, S. Kondo, H. Ryo y F. E. Würgelr (1985) Sumary report on the performance of *Drosophila melanogaster* assays. En: J. Ashby, F. J. de Serres, M. Draper y M. Ishidate (Eds). *Collaborative study of Short-term tests for carcinogens.* *Progress in Mutation Res.* 5: Elsevier/North. Holland, Amsterdam: 47-57

Wael M., R. y P. F. Cook (2004) Structure and mechanism of O-acetylserina sulfhydrilase. *J. Biol. Chem.* 279: 26803-26806

Wilkins F. E. y E. W. Vogel (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: *Chemical mutagens principles and methods for their detection.* (De serres, F. J. Eds.) Plenum Press. Nueva York Vol. 10. Pp 1-71.

Wilkinson C. F. y L. B. Brattsten (1972) Microsomal drug-metabolizing enzymes in insects. *Drug Metab.* 1: 153-227.

Wilson T. G. (2001) Resistance of *Drosophila* to toxins. *Ann. Rev. Entomol.* 46: 545:571.

Würgler F. E., U. Graf y H. Frei (1985) Somatic mutation and recombination in wing of *Drosophila melanogaster*, En: J. Ashby, F. J. de Serres, M. Draper y M. Ishidate (Eds) *Collaborative study of shorterm tests for carcinogens.* *Progress in Mutation. Res* 5. Elsevier/North. Holland. Amsterdam: 325-340 p.

Zijlstra J. A., E. W. Vogel y D. D. Breimer (1984) Strain differences and inducibility of microsomal oxidative enzymes in *Drosophila melanogaster* flies. *Chem. Biol. Interact.* 48: 317-338.

Zijlstra J. A. (1984) Bioactivation and inactivation of mutagens in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 130: 276-322.

Zijlstra J. A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Druk: Krips Repro Meppel.* p. 192.

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

Zimmering S. (1976) Utility of *Drosophila melanogaster* for detection of potencial environmental chemical mutagens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 269: 26-33.

Zordan M., M. Osti, R. Costa y A. Levis (1991) The effects of vinblastine in the SMART test in *Drosophila melanogaster* chromosome- specific aneuploidy? *Mutat. Res.* 252: 194-195.