

00346¹⁰

29/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD
GENOTOXICA DEL AMINOACIDO AZUFRADO
TAURINA Y ALGUNOS ANTAGONISTAS MEDIANTE
EL EMPLEO DE CELULAS SOMATICAS DE
Drosophila melanogaster.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
BIOL. MARIA GUADALUPE ORDAZ TELLEZ

MEXICO, D. F.

25-8428

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION
DISCONTINUA

PAGINACIÓN
DISCONTINUA



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA
DEL AMINOACIDO AZUFRADO TAURINA Y ALGUNOS
ANTAGONISTAS MEDIANTE EL EMPLEO DE CELULAS
SOMATICAS DE *Drosophila melanogaster*.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
BIOL. MARÍA GUADALUPE ORDAZ TÉLLEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MEXICO, D.F.

1998

**Este trabajo fue realizado en su totalidad en el
Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la
Universidad Nacional Autónoma de México.**



**Con el apoyo otorgado por:
La Dirección General de Asuntos del Personal Académico
(DGAPA)**

Proyecto: IN-207196-UNAM.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
de Posgrado

OF. NUM. P-1492

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES
P R E S E N T E.

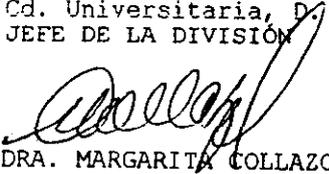
Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificada como Directora de Tesis del(a) alumno(a) BIOL. MARIA GUADALUPE ORDAZ TELLEZ, quién desarrolló el Trabajo de Tesis titulada: CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA DEL AMINOACIDO AZUFRADO TAURINA Y ALGUNOS ANTAGONISTAS MEDIANTE EL EMPLEO DE CELULAS SOMATICAS DE Drosophila melanogaster.

Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que la Dirección de la Facultad, los ha designado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DRA.	HERMINIA PASANTES MORALES
PRIMER VOCAL	: DRA.	SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO
SEGUNDO VOCAL	: DRA.	PATRICIA RAMOS MORALES
TERCER VOCAL	: DR.	LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
SECRETARIO	: DR.	JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
SUPLENTE	: DR.	MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO
SUPLENTE	: DRA.	MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 04 de Agosto de 1997.
JEFE DE LA DIVISIÓN


DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA
MCO\ASR\ipp&

Dedicatorias

Este trabajo lo dedico con especial cariño y respeto a mis padres: *Aida Téllez Grande y José Marcos Ordaz Silva*, por su confianza y apoyo que me brindan y por que esta meta es también su meta ¡Gracias por todo!.

A mis hermanos: *Arnulfo, Marcos, Felipe, Beatriz y Araceli* por su comprensión y cariño que me brindan en cada momento.

A mis queridos sobrinos: *Enrique, Aimeé, Alejandro, Bruno y al nuevo integrante de la familia Ordaz*, por compartir con ellos momentos inolvidables de una etapa que nunca se debe de olvidar.

Agradecimientos.

♣ A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Patricia Ramos Morales

Dra. Herminia Pasantes Morales

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Por sus valiosos aportes y críticas durante el desarrollo de este proyecto, y especialmente a la Dra. Patricia Ramos Morales por su entusiasmo, apoyo y por compartir sus conocimientos.

♣ A los miembros del Jurado:

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Jesús Javier Espinoza Aguirre

Dr. Mario Altamirano Lozano

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.

♣ A los compañeros de trabajo del Laboratorio de Genética.



ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	I
Enzimas involucradas en el metabolismo de genotóxicos.....	1
Factores que reducen el riesgo de cáncer.....	3
Bioensayos para el monitoreo de mutágenos ambientales.....	5
<i>Drosophila melanogaster</i>	6
Biología del desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Prueba de mutación y recombinación somática (SMART).....	10
Desarrollo del disco imagal del ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Descripción de los marcadores involucrados.....	15
Generalidades de la taurina.....	21
Distribución.....	21
Biosíntesis de la taurina.....	23
Aspectos clínicos y nutricionales.....	25
Funciones de la taurina.....	26
Papel protector de la taurina.....	26
Patologías en el humano.....	30
Consecuencias de la deficiencia en taurina.....	30
Análogos estructurales de la taurina.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Compuestos químicos.....	35
Pruebas preliminares de toxicidad.....	37
Líneas de <i>Drosophila</i>	37
Población de estudio.....	38
Diseño experimental.....	38
Análisis estadístico.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	94

RESUMEN

La taurina (2-amino etano sulfónico) es un aminoácido azufrado que actúa como neurotransmisor y contribuye a la estabilización estructural de las membranas, se le utiliza en la terapia contra crisis convulsivas, actúa como analgésico y su presencia confiere protección en distintos tipos celulares ante la presencia de otros compuestos. En el presente trabajo se evaluó la posible genotoxicidad de la taurina y sus antagonistas: la β -alanina y el guanidinoetano sulfonato (GES) en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Asimismo se determinó si la taurina confería protección ante la genotoxicidad inducida por la N-nitrosodimetilamina (DMN).

Los ensayos se realizaron mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) la cual utiliza las células de los discos imagales de las alas de *Drosophila melanogaster*, para valorar diferentes tipos de daño genético mediante la cuantificación de la inducción de clonas celulares que se manifiestan en el adulto por la aparición de manchas de tricomas o pelos que expresan los fenotipos mutantes con los que se marcaron las células de los discos imagales de las larvas.

Se emplearon larvas + *flr*³/*mwh* + las cuales fueron tratadas de la siguiente manera: para determinar la genotoxicidad de la taurina y sus antagonistas, las larvas se expusieron a las 24 ó a las 72 h de edad a diferentes concentraciones de éstas [0,5, 1, 5, 10, y 50 mM] en el medio de cultivo por un periodo de 48 h. Para estudiar el efecto de la taurina y sus antagonistas en la exposición al agente alquilante DMN, se usaron dos tipos de protocolos: 1) larvas de primer estadio se expusieron crónicamente a la taurina o sus antagonistas y después a la DMN de manera aguda, a continuación las larvas se enjuagaron y se transfirieron a medio de cultivo fresco hasta la emergencia de las moscas. 2) larvas de tercer estadio se expusieron en forma aguda a una mezcla 1:1 de DMN o agua + la solución de la taurina o sus antagonistas y posteriormente se transfirieron a medio fresco que contenía la concentración correspondiente de la taurina o sus antagonistas y en el cual permanecieron hasta la emergencia de los adultos. Se montaron las alas en laminillas y se registró el tipo, tamaño y localización de cada mancha y se comparó la

frecuencia obtenida en las series experimentales y sus testigos correspondientes.

La taurina y la β -alanina no mostraron ser genotóxicos por sí solos en larvas de primer o de tercer estadio.

En larvas de primer estadio la administración de taurina seguida por la DMN incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas inducidas por el testigo positivo. Este aumento fue mayor en las larvas de tercer estadio expuestas a la mezcla taurina-DMN y después a un tratamiento con taurina. Los resultados indican que la administración posterior de la taurina potencia aún más la genotoxicidad de la mezcla, tanto en larvas libres de inversión como en portadoras del cromosoma balanceador en las que además induce la expresión de novo de *mwh* y *flr*. Lo anterior se comprobó con moscas no marcadas para los atributos utilizados, es decir, de tipo silvestre las cuales fueron expuestas al mismo tratamiento y en las que se recobraron manchas de tipo *mwh* y *flr*.

Se seleccionaron dos compuestos estructuralmente semejantes a la taurina en las mismas concentraciones: β -alanina y Guanidinoetano sulfonato (GES) que difieren de la taurina en el extremo carboxilo o amino respectivamente. Al tratar larvas de primer estadio con la β -alanina y después la DMN se incrementó la frecuencia de manchas inducidas por la DMN. El efecto fue aun mayor en las larvas de tercer estadio expuestas a la mezcla de β -alanina + DMN, seguida por la exposición a la β -alanina hasta la formación del pupario ya que en las moscas se obtuvo una cantidad considerable de manchas de tipo *flr* que tienen una frecuencia de aparición baja. Al igual que en el caso anterior, la mezcla de GES + DMN incrementó la frecuencia de manchas tanto en larvas de primer estadio como en las de tercer estadio, siendo la genotoxicidad mayor en las últimas. La toxicidad de este tratamiento fue mayor en las larvas de 24 h.

Además se registraron alteraciones en la forma de los tricomas registrados y en otras estructuras que sugieren la interferencia de estos compuestos con los procesos de determinación y diferenciación celular de la mosca.

De los resultados obtenidos se concluyó que:

- la taurina y la β -alanina no fueron genotóxicos en células somáticas de *Drosophila*, sin embargo la interacción de estos compuestos con el agente

alquilante N-nitroso-dimetilamina (DMN) mostró potenciar el daño e interferir en la expresión génica durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

- Es necesario continuar los estudios con ambos análogos de la taurina (β -alanina y GES) utilizando otros mutágenos de referencia para llegar a establecer el mecanismo que interfiere en la expresión génica.
- La interacción de los compuestos con la DMN induce la aparición de manchas de tipo *flr* y *mwh*.

El efecto potenciador de la mezcla parece producirse por la combinación química entre los compuestos y la DMN.

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad se ha difundido el empleo de productos químicos para el control de plagas y el enriquecimiento de los suelos, así como el uso de numerosos agentes para preservar y conservar los alimentos, sin embargo el impresionante desarrollo de la química y la farmacología que ofrecen casi dos medicamentos nuevos por día, aumentan en forma alarmante día tras día el número de compuestos que ingresan al ambiente. Por ejemplo, en los países desarrollados más de 70,000 compuestos se distribuyen en el mercado libremente y cerca de 25,000 son de uso común, muchos de ellos tienen propiedades mutagénicas y algunos pueden además inducir cáncer (Salamanca, 1990), estos compuestos al ingresar al organismo pueden actuar básicamente de dos formas: de manera directa, los cuales son reactivos por sí mismos y pueden interactuar con las macromoléculas (ADN y proteínas) y aquellos de acción indirecta (promutágenos), es decir que requieren de la activación metabólica ya que no poseen propiedades genotóxicas *per se*, pero adquieren esta característica al ser convertidos a derivados reactivos electrofílicos (Obe y Natarajan, 1982).

Se ha descrito que la mayoría de estos compuestos químicos actúan por la generación de radicales libres que pueden funcionar como iniciadores endógenos de procesos degenerativos como el daño al ADN, mutación y promoción, los cuales se relacionan con el cáncer, el envejecimiento y las enfermedades del corazón (Ames, 1983; Carr, 1985).

Enzimas involucradas en el metabolismo de los agentes genotóxicos.

Actualmente hay evidencias de que el proceso de carcinogénesis involucra la formación de especies reactivas de oxígeno como el peróxido ($O_2\bullet$), hidroxilo ($OH\bullet$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peróxidos orgánicos y el oxígeno singulete (1O_2), que se generan por la transformación enzimática de xenobióticos y sus metabolitos, los cuales pueden atacar a los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, alterando el crecimiento y la diferenciación celular (Halliwell y Okezie, 1991).

Los sistemas enzimáticos responsables en gran medida de la transformación metabólica de los xenobióticos se localizan en el retículo endoplasmático liso, están formados por hemoproteínas intrínsecas unidas a la membrana, tienen un tamaño que va de 46 a 60 Kda y son producidas por numerosos genes conocidos como el paquete enzimático dependiente del

citocromo P450, que representa a una superfamilia de enzimas que se encuentra en bacterias, plantas y animales (Zijlstra y Vogel, 1988).

Se distinguen dos tipos de reacciones metabólicas: las llamadas de fase I (oxidación, hidrólisis o reducción) y la fase II (conjugación). Durante la fase I, las reacciones convierten al compuesto original en un metabolito más polar por la adición de uno o más grupos polares (tales como el hidroxilo OH) que son introducidos a las moléculas hidrofóbicas, por esta razón el compuesto original sirve como sustrato para la fase II y en las reacciones de fase II, o reacciones de conjugación o síntesis, los compuestos que contienen grupos funcionales apropiados (hidroxilo, amino, carbonilo o éoxido) se combinan con algunos sustratos endógenos para formar conjugados que aumentan la polaridad y reducen la liposolubilidad de la molécula para facilitar su excreción. Estas reacciones requieren A^TP como fuente de energía, coenzimas y transferasas (Vogel, 1992).

Si bien esta ruta metabólica es básicamente un mecanismo de desintoxicación, contribuye a la transformación genotóxica de promutágenos y procarcinógenos. De las enzimas de la fase I, uno de los grupos más importantes es el de las enzimas conocidas como oxidasas de función mixta dependientes de citocromo P450 o mono-oxidasas, las que se localizan en los microsomas del retículo endoplasmático de las células. Las reacciones requieren de oxígeno molecular y de fosfato de nicotinamida adenina-dinucleótido, en forma reducida (NADPH). Los equivalentes reducidos a base de NADPH participan, a su vez, en la reducción del oxígeno molecular, de modo que pueda ser transportado por un citocromo denominado P450 al compuesto por oxigenar, después el oxígeno se fija en los compuestos, habitualmente como grupo hidroxilo (Vogel, 1992).

Se sabe que la activación de carcinógenos esta relacionada con la oxigenación de sitios (enmascarados) de las moléculas, los cuales escapan a la conjugación y dan lugar a los reactivos electrófilicos intermediarios que producen alquilaciones en el ADN y se unen a proteínas formando neoantígenos o a enzimas con grupos tioles (-SH), provocando necrosis tisular (Parke, 1986).

Muchos agentes químicos que muestran una baja toxicidad por sí solos, son metabolizados a productos intermedios altamente reactivos, los cuales existen en forma de radicales libres capaces de interaccionar con el oxígeno de los tejidos produciendo lesiones autooxidantes. En los últimos años, se ha constatado que el oxígeno y el hierro, dos elementos esenciales para la vida,

son también poderosos agentes tóxicos y constituyen factores endógenos que pueden estar involucrados en el proceso de carcinogénesis (Parke, 1986).

El oxígeno es fácilmente reducido dando lugar al anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$) y después a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ambos radicales sumamente tóxicos son producidos por los leucocitos neutrófilos para destruir bacterias durante las infecciones microbianas. A su vez, el hierro ferroso es fácilmente oxidado a férrico en una reacción que puede acoplarse a la anterior, o bien, el férrico reducirse a ferroso, en forma tal que una baja concentración de hierro inorgánico puede, en presencia de agua y oxígeno molecular, generar ciclicamente superóxido. Aunado a lo anterior, el hierro inorgánico es capaz de catalizar la conversión del anión peróxido en radicales mucho más tóxicos, como radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$). Estos últimos se han asociado a la peroxidación de lípidos de las membranas y a la inducción de rompimientos cromosómicos y alteraciones de bases del ADN. La producción de radicales libres puede ser cuantificada por la determinación en orina de malonaldehído (que se forma por la descomposición de peróxidos de lípidos) así como de bases alteradas (Parke, 1986). Los organismos cuentan con mecanismos de defensa efectivos para protegerse de los radicales libres, entre los que se encuentran las enzimas superóxido desmutasa y catalasa, que catalizan la conversión del anión superóxido a peróxido y la de éste en agua y oxígeno (Parke, 1986).

Sin embargo, así como se han detectado agentes con potencial de riesgo genotóxico, también se han encontrado otro tipo de sustancias que disminuyen el efecto de la acción de los primeros. La forma de acción de estas sustancias es variada y en ocasiones puede tener un impacto totalmente distinto, así se habla de reacciones de sinergismo entre dos o varios compuestos; este tipo de reacciones surge por la presencia simultánea de varias sustancias en el organismo, las cuales reaccionan entre sí y producen un derivado más o menos dañino que cualquiera de las otras sustancias, o bien, ser susceptible de modificaciones adicionales por acción del metabolismo intrínseco a los organismos.

Factores que reducen el riesgo de cáncer:

El papel de los radicales libres como mediadores de la acción de factores exógenos y endógenos en la inducción de cáncer adquiere cada vez mayor importancia, a la vez que abre la posibilidad de interferir con la acción de estos compuestos peligrosos mediante el empleo de agentes anti-oxidantes,

reduciendo el riesgo de cáncer y otros padecimientos característicos del envejecimiento (Harman, 1981; Ames, 1989).

Particularmente en el campo de la salud ha sido importante el conocimiento de las propiedades de los compuestos que aparentemente confieren protección a los seres vivos, como ha sido el caso de las vitaminas y algunos metabolitos derivados de vegetales. La mayoría de los estudios realizados se han enfocado al aislamiento de los componentes individualizados que poseen, propiedades anticancerosas, hipertensoras y antimicrobianas demostrables (Muñoz, 1994; Greenwald *et al.*, 1995).

Una de las áreas en las que se realiza una extensa investigación es la referente a la identificación de agentes anticarcinógenos que pueden prevenir el desarrollo del cáncer. Esta línea de trabajo se inició a mediados de los 50, cuando los investigadores se enfocaron a la búsqueda de sustancias que inhibieran el desarrollo del cáncer. A esta práctica, Sporn (1995) le dio el nombre de quimioprevención. Estas investigaciones tienen como antecedentes los hallazgos que indican que la deficiencia de ciertos elementos de la dieta se asocia con una mayor incidencia de cáncer, o bien que, por el contrario, la incidencia de cáncer parece ser reducida al enriquecer la dieta con el consumo de cítricos, ciertos vegetales o alimentos. Existen, asimismo estudios epidemiológicos que parecen indicar que el consumo de β -caroteno (precursor de la vitamina A) puede jugar un papel protector y disminuir el riesgo de cáncer. Se sabe que la vitamina A participa en los procesos de diferenciación celular, por lo que posiblemente actúa como modulador de la carcinogénesis. Los estudios epidemiológicos apuntan hacia una mayor incidencia de cánceres de tipo epitelial, en pulmón, vejiga y laringe en individuos deficientes en vitamina A (Parke, 1986; Cortinas de Nava y Espinosa, 1990; Greenwald *et al.*, 1995).

Además se ha reportado que los β - carotenos son atrapadores de radicales libres y eficientes represores de oxígeno excitado, los cuales tienen actividad mutagénica y son además, particularmente eficaces para producir peroxidación de los lípidos (Peto *et al.*, 1981; Ames, 1983). Otras sustancias como vitamina C, retinoides, flavonoides y glutatión también atrapan radicales libres; de ahí que la nutrición sea un elemento esencial para la protección en contra de las lesiones autooxidantes.

Bioensayos para el monitoreo de mutágenos ambientales.

Las consecuencias de la exposición a sustancias químicas han sido estudiadas extensamente en las células germinales de diversos organismos, sin embargo con el tiempo se ha acumulado información del impacto del ambiente sobre las células somáticas, haciendo evidente la importancia de la detección y el estudio de este tipo de procesos sobre todo para el hombre, ya que muchos de ellos se relacionan con procesos cancerosos. Aunque los estudios epidemiológicos de poblaciones expuestas son un elemento valioso para la detección de carcinógenos también plantean numerosas desventajas. Entre ellas están la larga duración y alto costo de estos estudios, la multiplicidad de agentes de interferencia y, sobre todo, el hecho de que ponen en evidencia un riesgo cuando éste ya se ha producido.

La prevención de la carcinogénesis requiere la aplicación de métodos que permitan identificar oportunamente a los carcinógenos potenciales, así como el establecimiento de modelos biológicos para investigar los mecanismos implicados en la carcinogénesis.

El empleo de modelos animales para la identificación de agentes carcinogénicos y para estudiar sus mecanismos de acción en el desarrollo del cáncer se ha incrementado, hasta la fecha existe evidencia suficiente de la carcinogenicidad para el humano de alrededor de 50 sustancias, en su mayoría se trata de carcinógenos ocupacionales y de fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer, los cuales por lo general son capaces de inducir cáncer en animales de experimentación (IARC, 1987; Shelby, 1988).

Los modelos experimentales que se emplean para la caracterización genotóxica son muy variados, tanto por él o los organismos que utilizan, como por los eventos biológicos que detectan (International Programme on Chemical Safety, 1985). Varias son las características que se señalan para un sistema de prueba, entre estas destacan: que tenga bajo costo, corta duración, que detecte un amplio rango de eventos genéticos, que la respuesta encontrada sea reproducible, que sea sensible a compuestos que requieren de activación metabólica (promutágenos y procarcinógenos) y que favorezca el uso de tamaños de muestra satisfactorios, entre otras (De Serres, 1979; Kilbey *et al.*, 1981; Valencia *et al.*, 1984).

La eficiencia de este tipo de investigación en la identificación de agentes que representan un riesgo mutagénico y/o carcinogénico para los humanos se ha modificado en los últimos quince años (Ames *et al.*, 1973;

Clayson, 1980; Graf *et al.*, 1984). El empleo de los diversos bioensayos está enfocado hacia dos direcciones principales: una que consiste en la determinación del riesgo potencial que implica la exposición a los agentes en cuestión, tanto en relación con las células germinales como con las somáticas; y la otra centrada en la predicción de la asociación entre genotoxicidad y carcinogenicidad, involucrando el estudio de los posibles mecanismos de acción (De Serres, 1979; Vogel y Natarajan 1979 a y b; Todd *et al.*, 1983; Würigler *et al.*, 1983 a y b; Brusick, 1988).

Drosophila melanogaster:

Entre estos bioensayos se encuentra el sistema que emplea a la mosca de la fruta *D. melanogaster*, que reúne todas las características señaladas anteriormente, además de ser el eucarionte mejor conocido genéticamente (Fig. 1).

El ciclo de vida de *Drosophila* presenta un período de embriogénesis que ocurre en la etapa de huevo y una sucesión de estadios larvarios que culminan con una metamorfosis completa (holometábola) de la cual surge un imago o adulto. La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son: **huevo**, un día; **larva de primer estadio**, un día; **de segundo**, un día y **tercero**, un día; **pupa** 4.5 a 5 días. La duración del ciclo de vida completo es de 10 días en condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad relativa (60 %) (Zimmering, 1976) (Fig. 2). La duración de los estadios de su ciclo de vida, permite desarrollar protocolos versátiles, lo que representa otra ventaja adicional como bioensayo para evaluar contaminantes ambientales.

Biología del desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

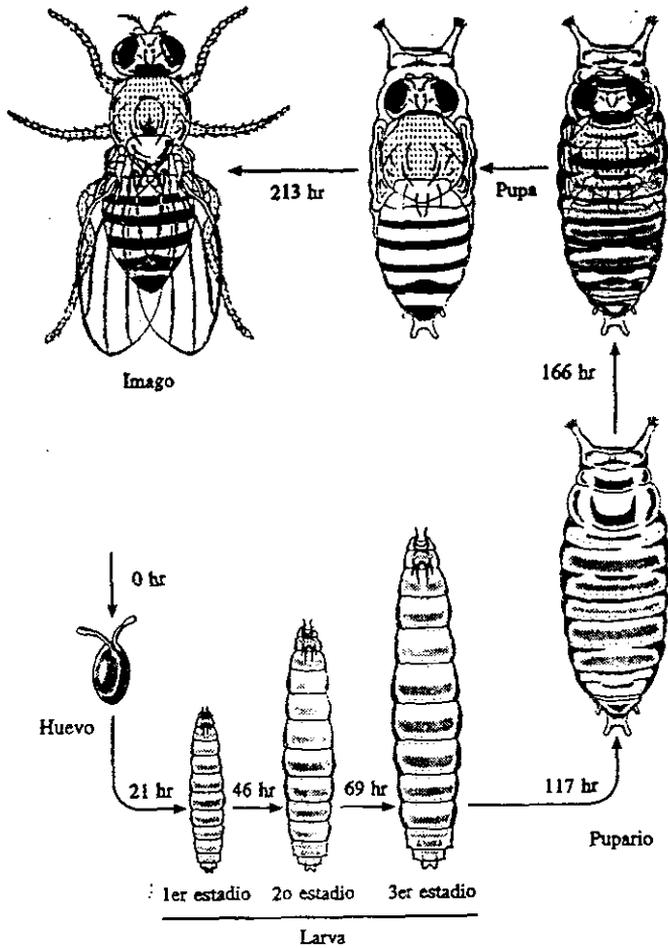
Huevo

La penetración del espermatozoide tiene lugar a través de una abertura llamada micropilo que se encuentra en el extremo anterior del óvulo. Los espermatozoides quedan almacenados en la hembra en el receptáculo seminal después de la cópula; la fertilización se realiza a medida que maduran los óvulos. Luego de la fecundación los huevecillos quedan en el útero durante los estadios más tempranos del desarrollo embrionario y posteriormente son depositados en el medio de cultivo. El huevo es de color blanco lechoso, tiene una longitud promedio de 420 μ , la superficie dorsal es aplanada y la ventral algo convexa, tiene un par de filamentos que son extensiones del corion

Fig. 1 Características de *Drosophila melanogaster*.

1. Es el eucarionte mejor conocido genéticamente.
2. Se pueden realizar estudios *in vivo* e *in vitro*.
3. El ciclo de vida es corto aproximadamente 9 a 10 días a 25 °C y con una humedad relativa de 60%, involucra un periodo de embriogénesis completo dentro del huevo y una secuencia de estadios larvales que derivan en una metamorfosis completa de la que finalmente surge un imago o adulto.
4. Tiene cuatro cromosomas perfectamente mapeados.
5. La presencia de un paquete enzimático en la fracción microsómica muy semejante a la del hígado de mamíferos, permite la biotransformación *in vivo* de los compuestos (Baars *et al.*, 1980).
6. Se conoce el tiempo de su gametogénesis (Chandley y Bateman, 1962).
7. Se mantiene en espacios reducidos y un costo relativamente bajo.
8. Se obtienen poblaciones numerosas: 500 organismos por pareja.
9. Dimorfismo sexual positivo hacia la hembra.
10. Tipo de exposición: de aguda a crónica.
11. Se pueden realizar estudios en células somáticas y células germinales.
12. Los agentes a probar es posible administrarlos por alimentación, inyección o en forma gaseosa, esto depende de las propiedades físico-químicas del compuesto y de los objetivos del trabajo a realizar.
13. Es sensible para detectar agentes teratógenos.
14. A la fecha se tienen alrededor de 12,000 cepas diferentes con marcadores específicos que permiten la evaluación de gran variedad de efectos genéticos y cromosómicos (Lindsley y Zimm, 1992; Zijlstra y Vogel 1988a).

Fig. 2 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.



situados en la región anterodorsal, los cuales impiden que se hunda el huevo en el medio de cultivo (Demerec, 1965).

Larva

La larva de *Drosophila melanogaster* presenta dos linajes celulares diferentes; las **células larvarias** y las **células imagales**, que dan lugar a las estructuras de la larva y del adulto respectivamente, las cuales divergen durante la embriogénesis. Una vez establecidas las células precursoras de los discos imagales, éstas siguen un desarrollo paralelo al larvario (Demerec, 1965; Anderson, 1972). Las **células larvarias** llevan al cabo las funciones vitales de esta edad y 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, 1986; Pomerai, 1990).

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 (Demerec, 1965). Las cuales 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 (Madhavan y Schneiderman, 1977), se unen por un tallo a las estructuras larvarias y se inervan 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 (Pearson, 1974). Los histoblastos no se diferencian durante el desarrollo larvario pero ésta da inicio con divisiones celulares, aproximadamente 3 horas antes de la pupación, doblando su número cada 3.6 horas, entonces aproximadamente 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).

Pupa

En la última muda larvaria, la cutícula se va endureciendo de manera paulatina y se torna oscura, posteriormente se forma el pupario. Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona 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.

La mayor parte de los órganos del adulto se forman a partir de los discos imagales ya presentes en la larva (Gilbert, 1990), o 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 su disco imagal respectivo, que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal dando lugar a las distintas partes del cuerpo del adulto (Fig. 3). El estadio pupal termina cuando emerge el adulto (Demerec, 1965).

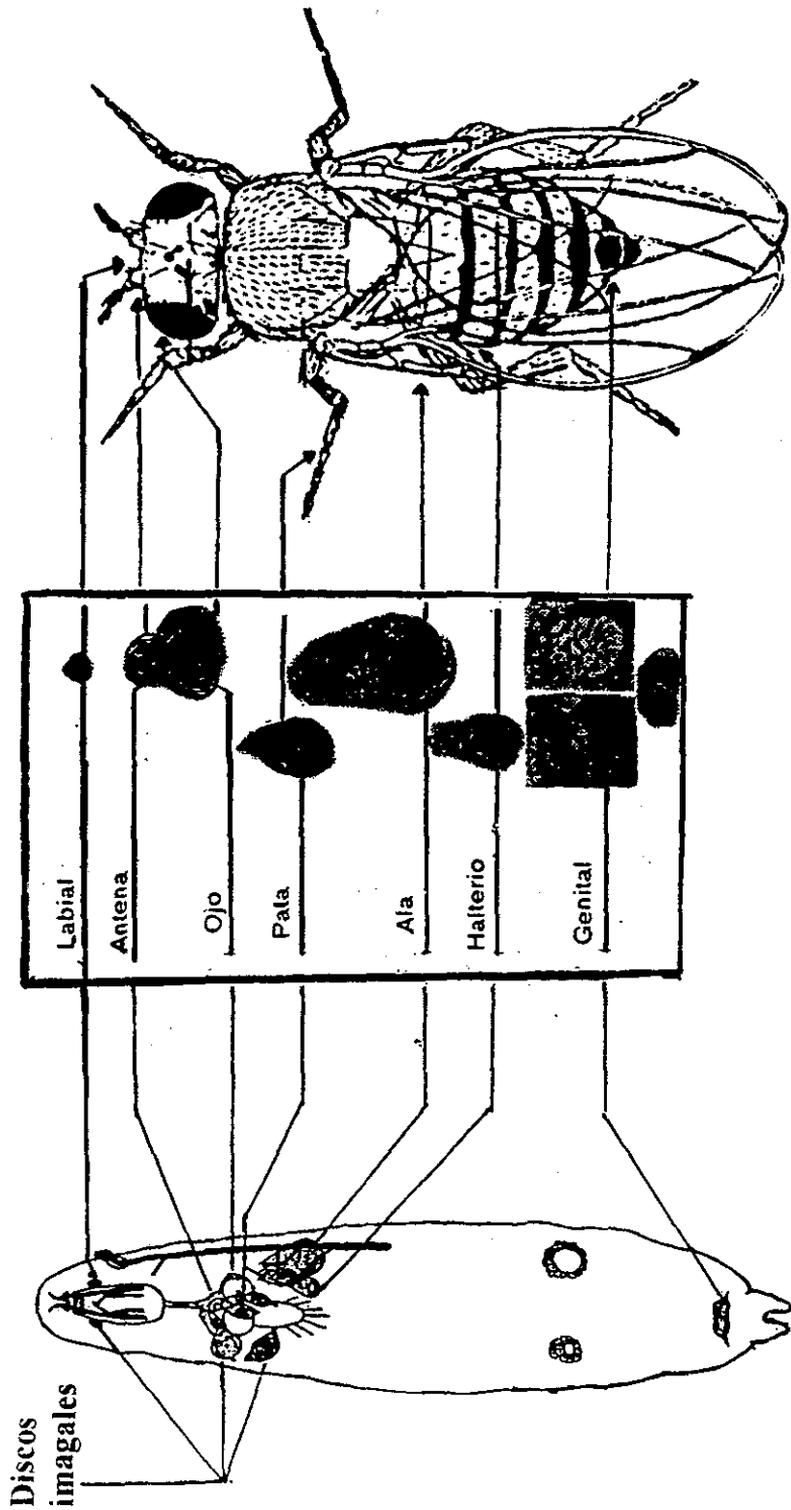
Adulto

El imago o adulto rompe el extremo anterior del pupario, por donde sale. 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. Ésta es la etapa reproductiva del ciclo de vida; el imago alcanza la madurez sexual a las 8 o 9 horas de edad (Demerec, 1965; Wilkins, 1986).

Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART):

Las células somáticas de *Drosophila* se emplean en la **prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)**, que permite detectar la capacidad de los agentes químicos para inducir mutación y recombinación a nivel somático (Golic 1991; Zordan *et al.*, 1991). Este tipo de estudios cobran cada día más importancia pues las evidencias experimentales indican una fuerte asociación entre la actividad recombinogénica y la carcinogenicidad (Ames *et al.*, 1973; Radman y Kinsella, 1980; Vogel *et al.*, 1980; Cairns, 1981; Katz, 1989; Negishi *et al.*, 1991).

Discos para:



Adulto de
Drosophila melanogaster

Metamorfosis

Larva

Fig. 3 Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* darán lugar a las diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas (Tomado de Gilbert, 1990).

Esta prueba fue propuesta por Graf *et al.* en 1983. En una de sus versiones utiliza las células de los discos imagales de las alas de *Drosophila melanogaster* (García-Bellido y Merriam, 1971 a y b) e involucra dos marcadores fenotípicos, es decir, que controlan los tricomas (pelos) de las alas: *flr*¹ (*flare*), pelos en forma de flama y *mwh* (*multiple wing hair*), pelos múltiples por célula (García Bellido y Merriam, 1971a; Graf *et al.*, 1984).

Una de las ventajas de este sistema es que el tiempo del ensayo es sólo de una generación (10 días), permite analizar un gran número de células blanco ($\approx 1,000,000$) en un tamaño de muestra de 40 alas (García-Bellido y Dapena 1974, Graf *et al.*, 1983, Vogel *et al.*, 1985 y Würgler *et al.*, 1985). El procedimiento experimental consiste en tratar larvas en etapas tempranas del desarrollo, previas a la metamorfosis (Fig. 4). La base fundamental de esta prueba considera que si durante la formación de las alas ocurren cambios en la información genética de las células se originarán clones celulares que se harán evidentes como manchas con fenotipo mutante que podrán distinguirse del resto de las células de tipo silvestre mediante la expresión fenotípica de los tricomas en la mosca adulta (García-Bellido y Merriam, 1971 a) (Fig. 5).

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 formado 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 (Whitte, 1990). 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 altamente plegado (García-Bellido y Merriam, 1971a; Crick y Lawrence, 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 el disco se evierte para formar la estructura correspondiente en el adulto.

Cuando el adulto emerge del pupario presenta las alas altamente plegadas; durante una hora aproximadamente, la mosca inyecta linfa a las alas (que son una especie de sacos que se extienden en forma gradual hasta

Fig. 4 Protocolo empleado para la prueba de mutación y recombinación somática (SMART).

Organismo empleado:	<i>Drosophila melanogaster</i>				
Ensayo:	Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)				
Líneas:	• $flr^3 / TM3, Ser$ • mwh / mwh				
Duración:	10 días				
Cruza:	$flr^3 / TM3, Ser \times mwh / mwh$				
Genotipo en la F1:	+ flr / mwh +  $TM3, Ser / mwh$ + 				
Células somáticas analizadas:	Tricomas (pelos) de las alas				
Vía de administración:	Alimentación a larvas				
Sincronización:	Durante 8 horas				
Control:	Sacarosa al 5%				
Repeticiones:	Dos				
Detección de genotoxicidad:	Número y tamaño de manchas				
Registro de datos:	Manchas chica Mancha grande Mancha gemela				
Tamaño de muestra:	120 alas				
Análisis estadístico:	X^2 para proporciones.				
Eventos genéticos:	<table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">• Mutación puntual</td> <td style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px;">• Pérdida</td> </tr> <tr> <td>• No disyunción</td> <td style="border-left: 1px solid black; padding-left: 10px;">• Recombinación</td> </tr> </table>	• Mutación puntual	• Pérdida	• No disyunción	• Recombinación
• Mutación puntual	• Pérdida				
• No disyunción	• Recombinación				

Desarrollo del disco del ala.

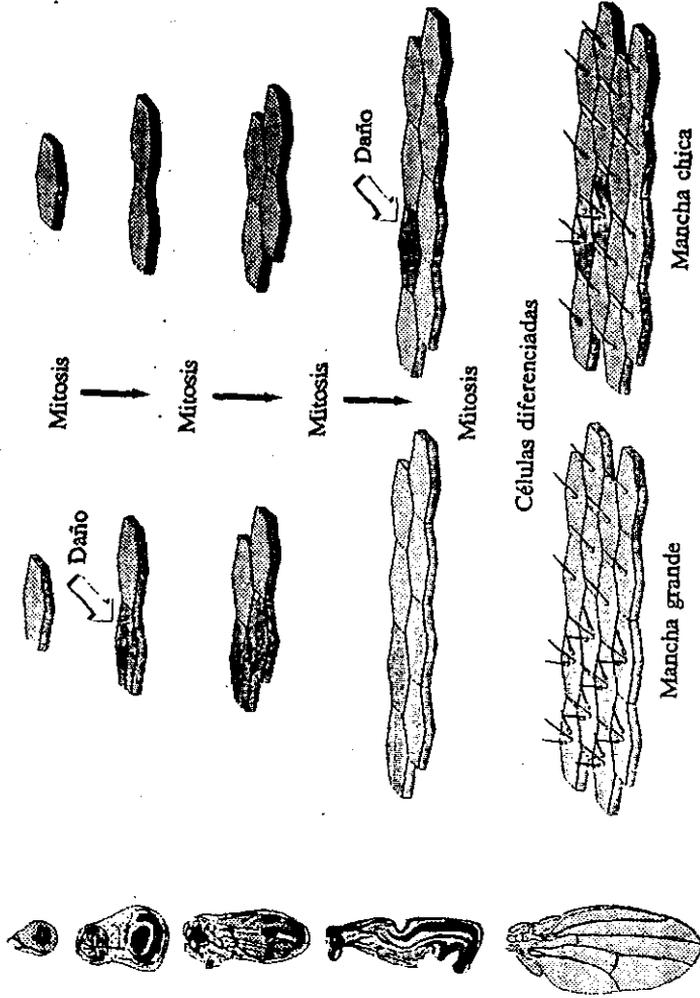


Fig. 5 Formación de clones celulares durante el desarrollo del ala (Tomado de Maldonado, 1994).

quedar turgentes) el contacto con el aire seca 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 (García-Bellido y Merriam 1971a; Crick y Lawrence, 1975). Cada ala esta formada aproximadamente por 30,800 células hexagonales de cada una de las cuales se origina un tricoma.

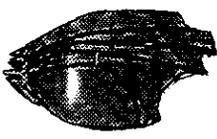
Descripción de los marcadores involucrados en la prueba de SMART:

Los marcadores utilizados en la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) son autosómicos recesivos y se localizan en el brazo izquierdo del cromosoma tres. El marcador *mwh* produce tres o más tricomas en lugar de uno por célula, como ocurre en las moscas de tipo silvestre (Graf *et al.*, 1984). La mutación *flr*³ (*flr*) es letal en condición homocigótica, pero resulta viable a nivel celular en mosaicos somáticos, en los que modifica a los tricomas en estructuras amorfas con expresividad variable. El cromosoma balanceador (*TM3, Ser*) se utiliza para mantener estable en los cultivos al alelo *flr*, este cromosoma porta inversiones múltiples que abarcan casi su totalidad y que impiden recobrar productos viables del proceso de recombinación en el cromosoma tres.

El alelo marcador del cromosoma balanceador es *Serrate* (*Ser*) que es fácilmente distinguible porque produce muescas en los bordes terminales de las alas, es totalmente dominante sobre el silvestre, *Ser*⁺ su expresión es variable y los organismos homocigóticos para *Serrate* mueren, lo que permite recuperar sólo a los portadores del marcador *flr* y el cromosoma balanceador (Lindsley y Zimm, 1992; Graf *et al.*, 1984; Delgado, 1990) (Fig. 6)

El ensayo SMART detecta eventos genéticos como mutaciones puntuales, pérdidas, recombinación mitótica y no disyunción. Aquellos eventos provenientes de mutación puntual, delección, no disyunción y recombinación (entre los marcadores utilizados *flr* y *mwh*), originarán una mancha simple en las que las células involucradas expresarán sólo uno de los marcadores mutantes. Mientras que los eventos de recombinación entre el marcador proximal (*flr*) y el centrómero, darán origen a manchas gemelas, en las cuales las células expresarán los dos marcadores de manera independiente. Por su origen las manchas gemelas son indicadoras de recombinación (Graf *et al.*, 1984; Jowett, 1991) (Fig. 7).

Fig. 6 Prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en células del ala de *Drosophila melanogaster*.

		<i>flr³ / TM3, Ser</i>		<i>mvh / mvh</i>
Líneas				
Marcaje genético		(<i>flr³</i>) flare	(<i>Ser</i>) Serrata	(<i>mvh</i>) multiple wing hair
Tipo de herencia		Letal recesivo	Letal dominante	Recesivo
Localización		3-38.8	3-91.9	3-0.3
Expresión		Forma del tricoma	Inhíbe la recombinación	Número de tricomas por célula
				

El cromosoma balanceador:

TM3, Ser (In (3LR)-TM3, y⁺ ri pP sep bx 34e e^S Ser)
 Porta inversiones múltiples que abarcan casi la totalidad del cromosoma 3 e inhibe la recombinación con su cromosoma homólogo

Fig. 7 Eventos que detecta la prueba de mutación y recombinación somáticas.

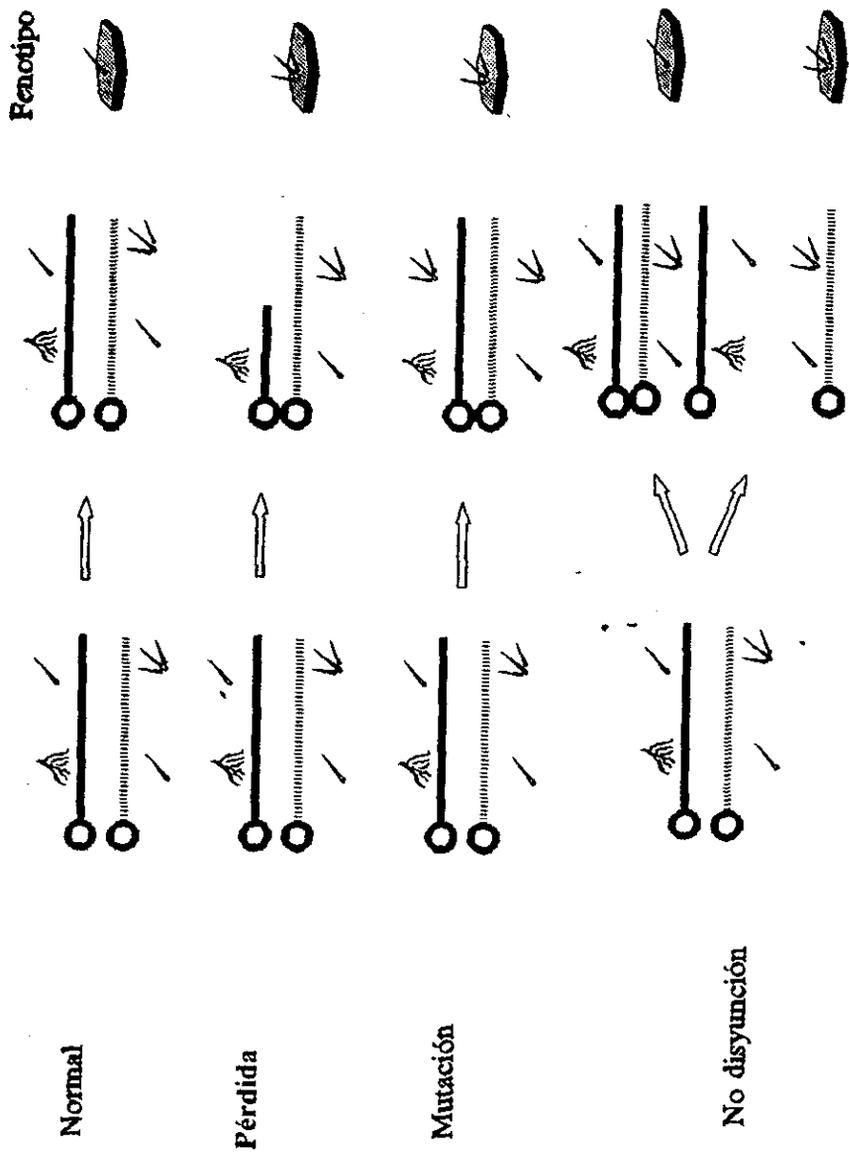
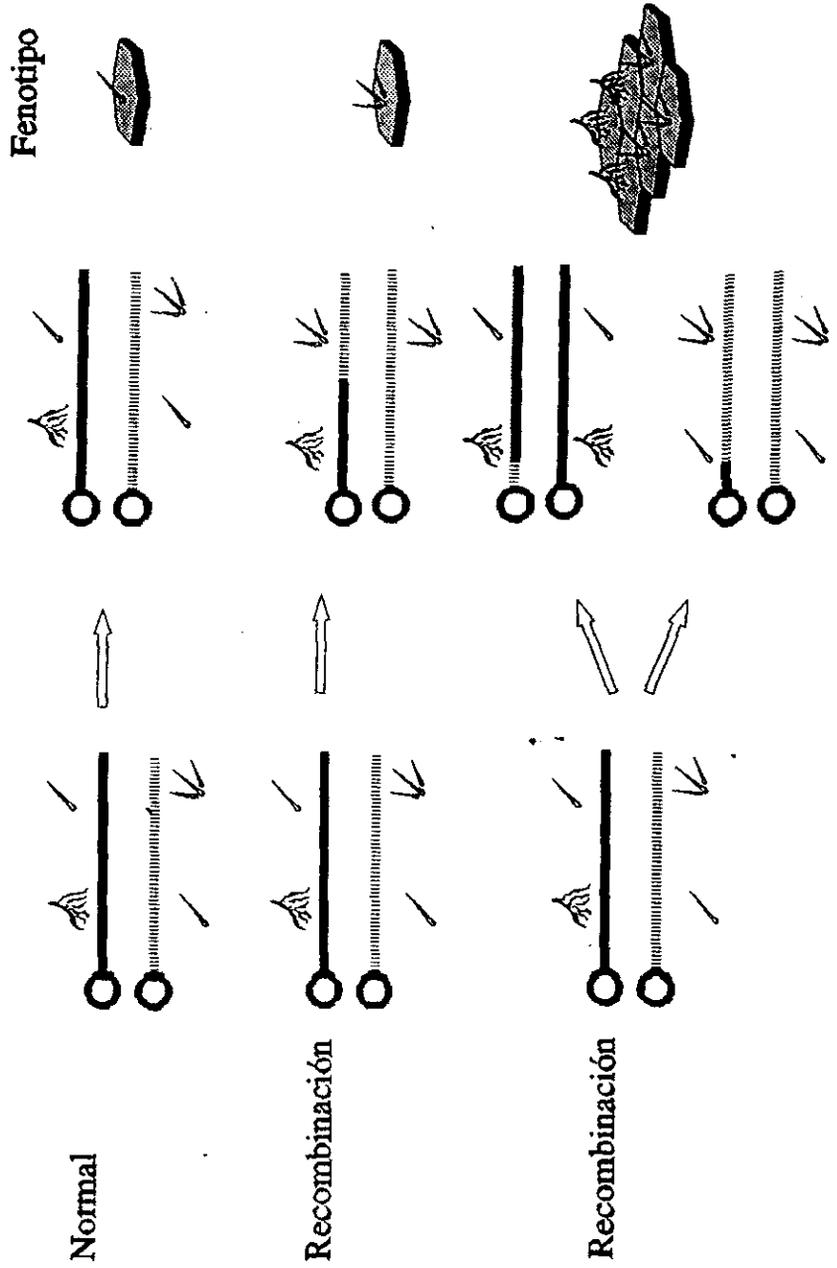


Fig. 7 Eventos que detecta la prueba de mutación y recombinación somáticas (continuación).



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) (García-Bellido y Merriam, 1971a; Graf *et al.*, 1984). De esta manera, el número de manchas recobradas en la mosca indica la frecuencia de eventos genéticos inducidos y se relaciona con la genotoxicidad del compuesto; mientras que el tamaño promedio de las manchas estima el tiempo en el que fueron producidas. Este último dato ayuda a distinguir a los compuestos que actúan directamente de aquellos que requieren ser biotransformados por el organismo (indirectos) y que en consecuencia son reactivos en etapas posteriores del desarrollo produciendo clones celulares de menor tamaño (Wright, 1980; Würzler *et al.*, 1983 b).

La frecuencia de clones (manchas) *mwh* se incrementa de manera exponencial conforme avanza la edad de la larva. Esto se basa en la suposición de que la duración del ciclo mitótico de una división a la siguiente, es constante y puede ser medida por el tiempo necesario para doblar el número de clones *mwh* por disco imagal del ala, el cual se estima en 8.5 horas, así se ha sugerido que el número total de células que forman el ala en el adulto se alcanza en 15.6 divisiones celulares (Szabad *et al.*, 1983) de éstas, las 3.5 divisiones nucleares originan a las 12 células primordiales del disco imagal durante las primeras horas del desarrollo; las otras 12 divisiones celulares podrían ocurrir en las 120 horas restantes (hasta 24 h después de la inducción de la pupación), lo que correspondería a 8.5 h por cada división. Al término del primer estadio larvario cada disco imagal del ala cuenta aproximadamente con 96 células, en el segundo con 768, en el tercero con 12,288 y finalmente en la pupación, poco antes de que empiece la diferenciación celular, cuenta ya con aproximadamente con 52,000 células (Tabla I) (García Bellido y Merriam, 1971a). La cantidad de células *mwh* por clon decrece con la edad de la larva tratada, lo cual coincide con la suposición de que el tamaño del clon celular, y por ende, de la mancha mutante producida, es inversamente proporcional al número de células en el disco imagal del ala al momento del tratamiento. En otras palabras, cuando la alteración que conduce a la formación de una mancha mutante ocurre en el desarrollo larvario temprano, se recobran pocas manchas pero de mayor tamaño, que cuando la alteración se presenta en los últimos ciclos de división. La frecuencia espontánea de manchas *mwh* por ala se encuentra en el intervalo 0.2 a 0.4 (García-Bellido y Merriam, 1971 a).

En resumen, el tipo predominante de las manchas inducidas por determinado compuesto químico (simples o gemelas) puede ser un indicador del tipo de evento inducido. Y el tamaño de las manchas producidas (tamaño

Tabla 1. Dinámica de crecimiento celular en el disco imagal del ala por horas y estadio larvario (Tomado de García-Bellido y Merriam, 1971a).

Horas (Ciclo de división)	# células en el disco imagal del ala	Estadio larvario
0	0	Ovoposición
21.0	12	Eclosión
29.5	24	1°
38.0	48	1°
46.5	96	1°
55.0	192	2°
63.5	384	2°
72.0	768	2°
80.5	1 536	3°
89.0	3 072	3°
97.5	6 144	3°
106.0	12 288	3°
114.5	24 576	3°
117.0	31 804	3°
123.0	49 152	División postpupación

promedio de clase clonal) estima la participación del metabolismo del organismo en la reactividad del compuesto (agentes directos e indirectos) (Graf *et al.*, 1984).

Generalidades de la taurina:

La taurina (2-amino etano sulfónico $C_2H_7NO_3S$) es un aminoácido azufrado, de bajo peso molecular con un alto grado de estabilidad y baja reactividad metabólica, interviene en la formación del ácido biliar y del ácido taurocólico (una sal biliar), fue descrito por primera vez en 1827 en la bilis del toro por Tiedman y Gmelin. Este aminoácido no es un constituyente universal de las proteínas y no interviene en el metabolismo de ningún tejido, exceptuando el hígado.

Distribución:

Diferentes estudios han demostrado que la taurina se encuentra en diversos organismos de la escala zoológica, siendo los moluscos el grupo que presenta las concentraciones más elevadas (Jacobsen y Smith, 1968).

Se localiza en altas concentraciones en: esqueleto, músculo (estriado, liso y cardiaco), corazón, glándulas de secreción, páncreas, bazo, glándulas pineal y pituitaria, plaquetas, células linfoblastoides, riñón, retina, cerebro y en los tejidos excitables (Vellan *et al.*, 1970; Pasantes-Morales *et al.*, 1972; Ahtee *et al.*, 1974; Huxtable, 1986 y 1992; Wright *et al.*, 1986) y está ausente en la mayoría de los tejidos vegetales, excepto en algunas semillas de oleaginosas como: avellana, nuez de la india, almendras y piñón y en las leguminosas: frijol, lentejas, garbanzo y habas, que contienen altas concentraciones de este aminoácido (Pasantes-Morales *et al.*, 1989; Flores, 1991).

La cantidad de la taurina en los tejidos se mantiene constante por el equilibrio entre los procesos de biosíntesis, acumulación y excreción (Sturman, 1973). Sin embargo, varía dependiendo de la especie, órgano, edad y la etapa de desarrollo del organismo (Jacobsen y Smith, 1968; Crabai y Pepeon, 1979). Por ejemplo, la distribución de taurina en las diversas regiones del sistema nervioso es heterogénea (Tabla II). Los niveles más elevados de taurina se encuentran en el cuerpo estriado, el hipocampo, el bulbo olfatorio y la retina mientras que las concentraciones más bajas se localizan en la médula espinal. Los niveles de taurina en el tejido nervioso se mantienen constantes, excepto durante el desarrollo cuando su concentración en casi

Tabla. II Distribución de la taurina en diferentes regiones del sistema nervioso central del adulto (μ moles /g) (Tomado de Pasantes-Morales, 1993).

Región	Ratón	Rojo	Galgo	Mono	Humano
Médula espinal	2.1	1.2	1.7	-	1.3
Tallo cerebral (protuberancia-bulbo)	-	2.4	2.1	0.8	-
Cerebelo	9.1	4.7	2.7	1.7	3.3
Hipotálamo	4.8	2.5	1.8	0.9	1.1
Cuerpo estriado	11.9	8.0	-	1.6	-
Hipocampo	-	6.8	1.9	-	-
Corteza cerebral	10.0	5.1	2.1	1.5	1.4
Bulbo olfatorio	-	7.6	-	-	-
Retina	22.0	12.6	7.9	-	-

todas las regiones del sistema nervioso disminuye en forma gradual a la maduración del tejido, de tal forma que en el adulto son siempre menores que en el cerebro inmaduro. Los estudios sobre la distribución subcelular del aminoácido muestran que se presenta principalmente en forma soluble, aunque hay una fracción pequeña de la poza asociada a membranas (Pasantes-Morales, 1983).

Biosíntesis de la taurina:

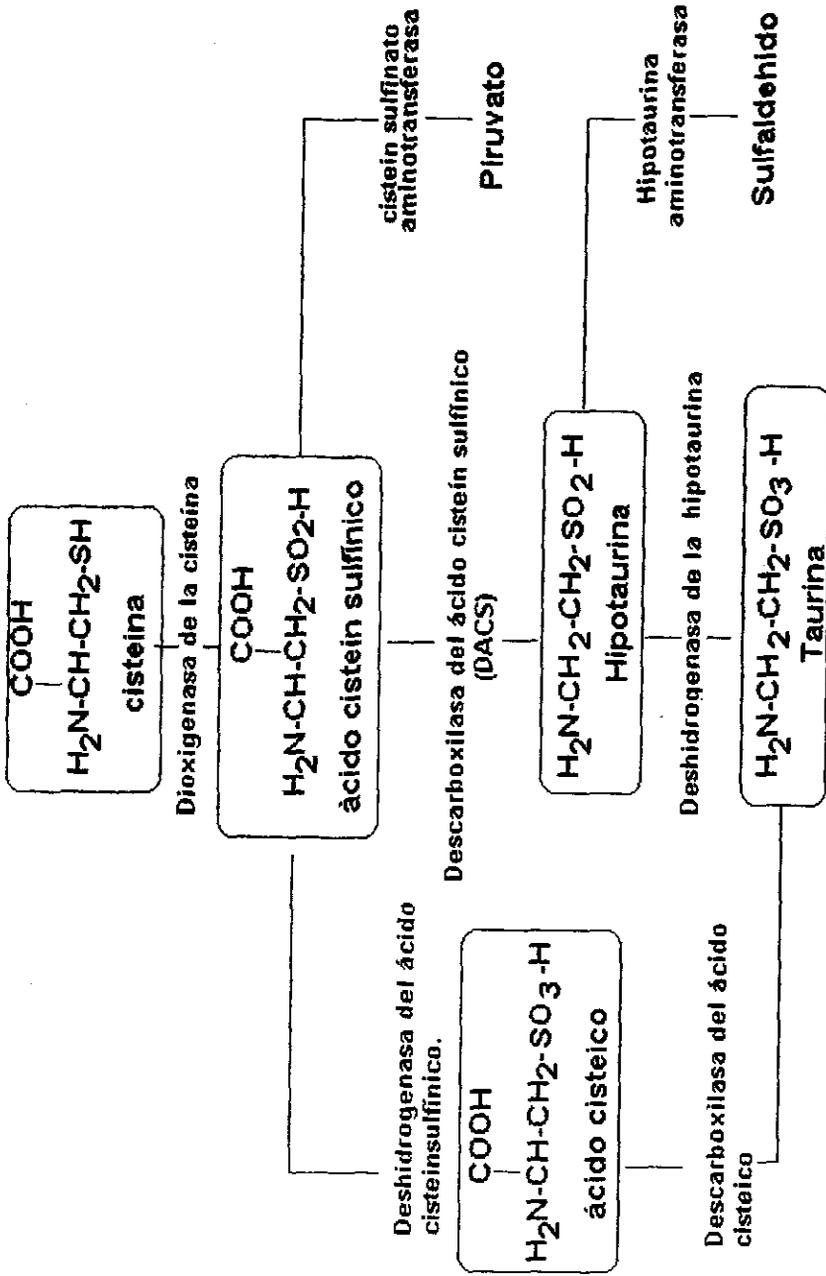
En los tejidos animales, el precursor en la síntesis de la taurina es el aminoácido azufrado cisteína, obtenido de la dieta o a partir de la conversión de la metionina (Jacobsen y Smit 1968) en una ruta metabólica en la que participan una serie de moléculas azufradas e implica reacciones de desmetilación, descarboxilación y oxidación. En el paso de la metionina a la cisteína, hay pérdida de grupos metilos (CH_3) y luego oxidación de grupos SH a sulfito, como ácido cistein sulfínico a hipotaurina (Weistein y Griffith, 1987).

Existen varias vías metabólicas para la conversión de cisteína en taurina en los distintos tejidos animales, en el caso del sistema nervioso, es por medio de la oxidación de la cisteína por acción de la dioxigenasa de la cisteína (DC), para formar el ácido cisteinsulfínico. Éste a su vez es descarboxilado mediante la descarboxilasa del ácido cisteinsulfínico (DACS), formando hipotaurina, la cual por oxidación da lugar a la taurina (Pasantes-Morales, 1983) (Fig. 8). Una vía alterna es a partir del intermediario ácido cisteinsulfínico el cual por oxidación forma el ácido cisteico que por descarboxilación posterior origina a la taurina (Jacobsen *et al.*, 1964). Para su síntesis se han descrito otras posibilidades, por ejemplo, la que involucra a la cisteamina como intermediario entre la cisteína y la hipotaurina. Se ha propuesto la incorporación directa de sulfato inorgánico para formar el ácido cisteico, sin embargo las evidencias experimentales son escasas (Pasantes-Morales, 1983).

Las enzimas implicadas en la síntesis de la taurina han sido identificadas y localizadas en diferentes tejidos de vertebrados. La enzima que ha sido objeto de más estudios es aquella que transforma el ácido cistein sulfínico en la hipotaurina, que al parecer es la etapa limitante de la biosíntesis en algunas células (Agrawal *et al.*, 1971).

La degradación metabólica de la taurina aún no se conoce. La única reacción descrita, es la conversión a ácido isetiónico. Los estudios realizados

Fig. 8 Síntesis de la taurina



sobre la vía de síntesis de la taurina indican que durante las primeras etapas del desarrollo se produce menor cantidad del aminoácido que durante la etapa adulta y que los fetos y los animales jóvenes son dependientes de sus madres para obtener un adecuado suplemento (Pasantés-Morales, 1983).

La cantidad de taurina que existe en un tejido específico puede estimarse no sólo desde el punto de vista de la biosíntesis o de la degradación, sino también de su capacidad de transporte y captación por diversas células (Cañas y Valenzuela, 1991).

Aspectos Clínicos y Nutricionales:

Se ha demostrado la gran importancia clínica de la taurina como nutriente esencial condicional para humanos, gatos y monos, en los que la síntesis es limitada por lo que dependen del aporte exógeno de la taurina a través de la dieta para mantener sus pozos tisulares (Hayes y Sturman, 1981; Chipponi *et al.*, 1982; Vinton *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 1986). Mientras que animales como rata, conejos y cobayos sintetizan la taurina. En el humano se ha encontrado que la deficiencia de taurina en la dieta provoca disfunción hepática severa y se han encontrado cambios en el electroretinograma asociados a bajos niveles de este aminoácido en el plasma, por lo anterior la taurina es importante en la conjugación de ácidos biliares secundarios especialmente del ácido litocólico lo que puede explicar su papel en el proceso de disfunciones hepáticas (Gall *et al.*, 1977; Hayes, 1985; Ament *et al.*, 1986).

Por lo anterior diversos estudios se han enfocado a determinar la presencia de la taurina en una gran variedad de alimentos, de los cuales se ha demostrado que el tejido muscular contiene altas concentraciones, haciendo evidente que la carne es la principal fuente dietaria de este aminoácido. Al analizar con detalle los niveles de taurina en diferentes tipos de carne se describe que los moluscos presentan concentraciones elevadas, mientras que en la carne de res, de cerdo y de ovinos, los niveles van de 2 a 6 $\mu\text{mol/g}$; la carne de las aves, especialmente la de pollo, presenta diferencias dependiendo del tipo de músculo; se ha observado que las cantidades son considerablemente distintas entre los músculos rápidos y los lentos, como los pectorales, que contienen una concentración menor, de 1 a 2 $\mu\text{mol/g}$ (Montenegro, 1987).

En la actualidad existen pocos estudios sobre el contenido de taurina en los vegetales y son notablemente escasos los que muestran un enfoque nutricional.

Funciones de la taurina:

Este compuesto tiene varias funciones biológicas en diversos órganos, entre las que se le atribuyen las de: osmoregulador, regulador del flujo del ión calcio, regulador de la proliferación celular, estimulador de la glicolisis y glicogénesis, modulador de la excitabilidad neuronal, desintoxicación, en la homeostasis, en la estabilización de la membrana y como antioxidante (Thurston *et al.*, 1980; Emudianughe *et al.*, 1983; Gauld *et al.*, 1983; Kulakowski y Maturo, 1984; Bernardi, 1985; Sebring y Huxtable, 1985;) (Tabla III), los cuales posiblemente se relacionan con la interacción de la taurina con el ión calcio de la célula (Masao, 1990).

Papel protector de la taurina:

Se ha encontrado que este aminoácido presenta un efecto protector contra las alteraciones de la excitación nerviosa; el tratamiento con taurina es efectivo en las crisis convulsivas en una extensa variedad de modelos experimentales, así como en algunas formas de epilepsia en el hombre, lo que hace pensar que su mecanismo de acción se ejerce mediante una modificación generalizada de la excitabilidad de la membrana neuronal (Sbabaro, 1974; Pasantes-Morales, 1983).

Sbabaro (1974) describió que la taurina tiene acción analgésica y participa en el control central de la temperatura corporal, el hambre y la sed (Lipton y Ticker, 1979). En el sistema cardiovascular regulariza el ritmo cardíaco en arritmias provocadas experimentalmente (Read y Welty, 1963; Welty y Read, 1964). Por otra parte, se ha reportado que en individuos con insuficiencia cardíaca congestiva los niveles de taurina en el corazón son muy elevados (Huxtable y Bressler, 1974), al igual que en músculo esquelético en casos de distrofias congénitas (Baskin y Dagimanjian, 1973); además de un efecto protector sobre las estructuras de las células visuales de la retina (los fotorreceptores). Al exponer los bastones aislados de la retina a iluminación normal se deforma su estructura con el tiempo, pero esto se evita si la taurina está presente en el medio, con lo que las células se mantienen en perfectas condiciones, incluso mejor que las que se encuentran en la oscuridad, esta acción protectora se debe a la interacción de la taurina con flujos iónicos (Pasantes-Morales, 1994).

Tabla. III Participación de la taurina en varios procesos biológicos.

Estudios que muestran algunas de las funciones de la taurina	Referencias
* Formación del ácido taurocólico y taurodesoxicólico a través de la conjugación con ácidos biliares en el hígado.	Spaeth y Schneider, 1974; Hayes y Sturman, 1981
* Tiene un papel fisiológico en el sistema nervioso central y en el corazón	Albertini <i>et al.</i> , 1992
* Actúa como un osmólito, es decir, regula la concentración de agua en la célula al mover el líquido de un lado a otro de la membrana, sin alterar el metabolismo celular manteniendo el volumen constante.	Pasantes, 1994
* Hay evidencias de que puede funcionar como neurotransmisor o neuromodulador del Sistema Nervioso Central (SNC).	Davison y Kaczmarek, 1971; Fluxtable, 1989
* Como osmoefector en la fisiología del músculo esquelético y del tejido nervioso de mamíferos.	Thurston <i>et al.</i> , 1981; Wade <i>et al.</i> , 1988; Solis <i>et al.</i> , 1988
* Tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y también un efecto protector contra algunos estados patológicos.	Masao, 1990
* En humanos y conejos estimula la proliferación de las células del epitelio pigmentario retinal.	Gabrielian <i>et al.</i> , 1992
* Está involucrada en los mecanismos de regulación del volumen celular en tejidos de vertebrados euritalinos y marinos.	Florkin y Schoffeniels 1965; Gilles, 1979; Vislie, 1983

Con base en los estudios del efecto protector de este aminoácido en los distintos tipos celulares se postula que podría jugar un papel relevante en la estabilización de las membranas y actuar como un osmoregulador (Thurston *et al.*, 1980). Se ha reportado que la taurina tiene un papel antioxidante que reside en la capacidad de atrapar moléculas de hipoclorito (que pueden causar daño celular) para formar taurocolaminas estables, particularmente en reacciones donde hay formación de H_2O_2 y que requieren cloruro (Thomas *et al.*, 1983). Por lo cual la taurina puede ser esencial en cultivos de células linfoblastoides y en las reacciones de fagocitosis o donde hay producción de moléculas oxidantes (Pasantés-Morales *et al.*, 1985; Masuda *et al.*, 1986). En la tabla IV se muestra el papel protector de este aminoácido contra la acción de varios compuestos.

Tabla. IV Estudios que muestran algunos efectos de la taurina.

Especie	Efectos	Compuesto	Referencia
Células de criceto	Protege contra el daño bronquiolar	dióxido de nitrógeno	Gordon <i>et al.</i> , 1986
Fibroblastos de pulmón de rata	reduce el daño pulmonar	bleomicina	Wang <i>et al.</i> , 1989
Pulmón	reduce la peroxidación lipídica	tetracloruro de carbono	Nakashima <i>et al.</i> , 1983
Hepatocitos de rata	reduce la citotoxicidad	hidrazina 1-4 Naphthoquinona tetracloruro de carbono	Waterfield <i>et al.</i> , 1993
Célula linfoblastoides	reduce la citotoxicidad reduce la muerte celular aproximadamente a nivel del control	retinol hierro-ascorbato	Pasantes-Morales <i>et al.</i> , 1985
Células de ovario de criceto chino	disminuye la frecuencia de aberraciones cromosómicas, ICH y restaura el índice mitótico	retinol y ac. retinoico	Pasantes-Morales <i>et al.</i> , 1984
Rata, ratón y gato	protege contra convulsiones	peróxido de hidrógeno	Cozzi <i>et al.</i> , 1995
		estricnina, metrazol, ouabaina y 4-amino piridina	Mandel y Pasantes-Morales, 1978

Patologías en el humano:

Estudios realizados en el Hospital de la Ceguera en pacientes con retinosis pigmentaria tratados con taurina, se observó que la disminución del campo visual se detuvo en el 70% de los que recibieron el tratamiento, posiblemente la taurina actúa como estabilizador de la estructura de los fotorreceptores, para mantener sus membranas más estables y resistentes (Pasantes-Morales, 1994; Wright *et al.*, 1986).

En humanos el síndrome 3p⁻ se debe a la pérdida del brazo corto del cromosoma 3, e incluye retraso mental, crecimiento retardado, microcefalia, hipotonía, ptosis y micrognatia. La pérdida del gen transportador de la taurina (TAUT), ocasiona disminución de los niveles de la taurina y posiblemente contribuye a algunas de las características fenotípicas del síndrome 3p⁻ (Phipps *et al.*, 1994). Actualmente se ha identificado el gen del transportador de la taurina en el cromosoma 3 en humanos en la región 3p21-p25 (Patel *et al.*, 1994).

La relación que tiene la taurina con otras enfermedades no se conoce aún del todo, pero la ausencia de este aminoácido produce en algunas especies como el gato una cardiomiopatía asociada a bajos niveles de taurina plasmática (Pioin *et al.*, 1987). También la deficiencia de taurina se ha asociado con problemas de tipo inmunológicos y reproductivos y con la falta de visión (Hayes *et al.*, 1975).

Consecuencias de la deficiencia de taurina:

Al someter a gatos a una dieta deficiente de taurina se presenta disminución progresiva de los niveles tisulares de este aminoácido, después de un tiempo prolongado se manifiestan alteraciones en el electroretinograma (ERG) y en la estructura de los fotorreceptores, los cambios se caracterizan por vesiculación, desorientación y desintegración de las células fotorreceptoras de los segmentos externos ocasionando la muerte de las células fotorreceptoras y la pérdida irreversible de la capacidad visual (Hayes, *et al.*, 1975a; Hayes, *et al.*, 1975 b; Berson *et al.*, 1976; Schmidt *et al.*, 1977; Imaki *et al.*, 1986). El proceso deteriorante causado por la deficiencia de taurina es irreversible en sus etapas avanzadas; sin embargo, su inclusión en la dieta, antes de que rebese un nivel crítico, previene la aparición de las alteraciones visuales y cuando los procesos de degeneración no están muy avanzados, la presencia del aminoácido puede revertirlos (Berson *et al.*, 1976).

Se ha demostrado que la deficiencia de esta sustancia ocasiona problemas en los animales, que no son capaces de fabricar la taurina y solamente la obtienen de la dieta. Uno de los padecimientos que se presentan en el gato es la muerte de los fotorreceptores, además la taurina es necesaria para asegurar el adecuado desarrollo del cerebro. En animales cuyas progenitoras son deficientes en taurina se ha observado que el cerebro presenta un notable retraso en la diferenciación y migración de las neuronas (Pasantes-Morales, 1994).

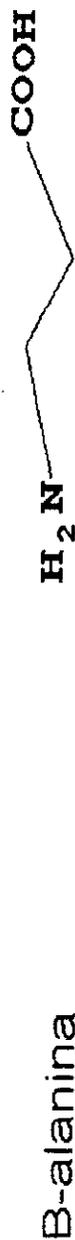
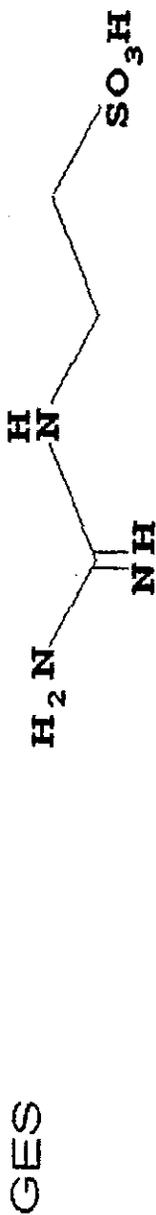
En el caso del hombre el efecto no es tan marcado debido a que los tejidos, incluyendo la retina, conservan una poza de taurina y por el consumo de carne y pescado, que contienen altas concentraciones (Flores, 1991).

En el mono, al sustituir la alimentación materna por fórmulas lácteas carentes de taurina, también se produce alteración en los fotorreceptores, principalmente en los segmentos externos de los conos causando la pérdida de la agudeza visual y retraso en la organización de las células de la corteza cerebral, mientras que en los monos alimentados con fórmulas suplementadas con taurina no hubo alteración (Sturman *et al.*, 1984; Neuringer *et al.*, 1985; Neuringer y Sturman, 1987).

Análogos estructurales de la taurina:

Entre los aminoácidos que disminuyen los niveles de la taurina se encuentran el derivado guanidino etano sulfonato (GES) y la β -alanina que son análogos estructurales de la taurina que difieren en el extremo amino ó carboxilo respectivamente (Fig. 9). Ambos análogos comparten el mismo transportador por lo cual son transportados en lugar de la taurina por el sistema de los β -aminoácidos dando lugar a una disminución de la taurina y un incremento del análogo, además se ha reportado que el efecto del GES no es del todo específico para la taurina, ya que otros aminoácidos se ven afectados y sus concentraciones pueden cambiar (Marnela *et al.*, 1984). Se ha informado que en animales y células en cultivo tratados con el GES hay una disminución eficiente de la taurina (Moran y Pasantes-Morales, 1991), mientras los tratamientos con la β -alanina son menos eficientes y tóxicos (Pasantes-Morales *et al.*, 1983; Lake y DeMarte, 1988).

Fig. 9 Fórmulas de los compuestos empleados



JUSTIFICACIÓN:

En el ambiente se encuentra una gran variedad de sustancias naturales o sintéticas cuya capacidad mutagénica y/o carcinogénica se desconoce en gran medida, por lo que es necesaria la determinación de su mutagenicidad para identificar aquellas que representan un riesgo para la salud y desarrollar medidas de control en su uso o exposición. De ahí que las pruebas de corta duración sean consideradas como excelente opción en el área del monitoreo ambiental, ya que han contribuido de manera importante a detectar compuestos dañinos, constituyéndose en herramientas valiosas para los programas de prevención.

Existe una gran variedad de compuestos mutagénicos y cancerígenos que generan radicales libres que dañan al ADN. El interés se ha enfocado al estudio de compuestos antioxidantes y a la identificación de aquellas sustancias capaces de atrapar radicales exógenos y que por ende, reducen los efectos de los compuestos genotóxicos (Hartman y Shankel, 1990); entre estos se encuentran vitaminas, minerales y fenoles que han mostrado un efecto inhibitor de la acción de carcinógenos.

Diversos reportes sugieren que la taurina tiene efecto protector en distintos tipos celulares y que actúa como un antioxidante directo, es decir atrapa radicales libres y otras moléculas que pueden causar daño celular (Kataoka y Ghuishi, 1986; Walz, 1987; Laidlaw *et al.*, 1989) y como un antioxidante indirecto, que impide cambios en la permeabilidad de la membrana debido al daño oxidante (Wright *et al.*, 1986). Asimismo se ha mostrado que la taurina puede estabilizar la membrana celular (Giri y Wang, 1992).

En el presente trabajo se utilizó la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en células de las alas de *Drosophila melanogaster*, utilizando las ventajas que presenta la duración de la fase larvaria de *Drosophila* en la cual es posible exponer a las larvas a más de un tratamiento, de manera que se puede determinar si el orden de administración de la taurina y la N-nitrosodimetilamina (DMN) modifica su genotoxicidad o bien, al administrarse simultáneamente ambos compuestos se puede estimar si la interacción química entre ellos altera el efecto inducido. Por lo anterior fue necesario evaluar además la actividad genotóxica de la taurina.

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el potencial protector del aminoácido azufrado “taurina” sobre la genotoxicidad del mutágeno: N-Nitrosodimetilamina (DMN) en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Investigar una posible actividad mutagénica y recombinogénica de la taurina en células de las alas de *Drosophila melanogaster*.
2. Detectar el potencial protector de la taurina administrada antes y en combinación con un mutágeno de referencia: N-Nitrosodimetilamina (DMN).
3. Comparar la actividad mutagénica y recombinogénica de β - alanina y GES dos antagonistas de la taurina en células de las alas de *Drosophila melanogaster*.
4. Evaluar la actividad antimutagénica y recombinogénica de los dos antagonistas de la taurina con la DMN en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

MATERIALES Y MÉTODOS

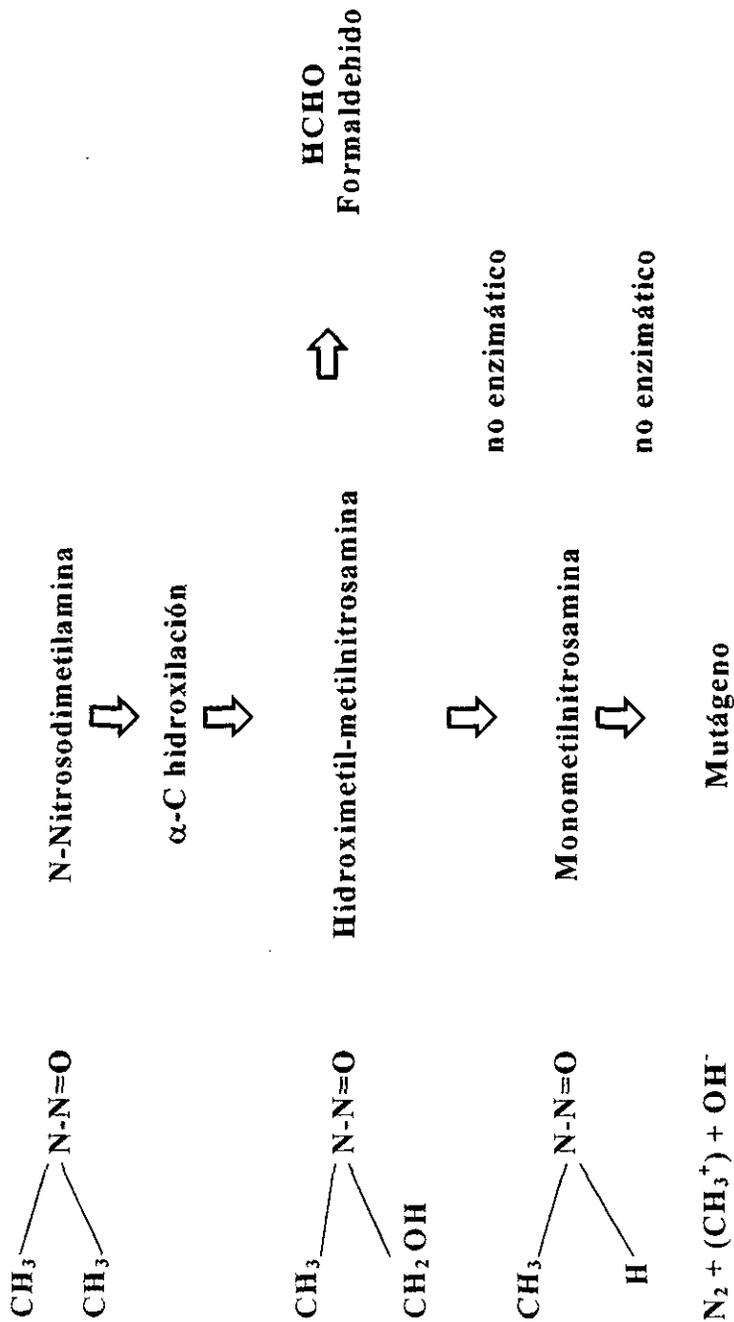
Compuestos:

N-Nitrosodimetilamina (DMN):

La DMN es un líquido amarillo de baja viscosidad, miscible en agua, soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y en lípidos, muy volátil, su fórmula química es $(\text{CH}_3)_2\text{NNO}$, está formada por C (32.42 %), H (8.16%), N (37.82 %) y O (21.60 %), peso molecular; 74.08 g, densidad; 1.0048 (Index Merck, 1989). Es usada como disolvente en la industria del plástico y la fibra, como antioxidante, aditivo para lubricantes y en condensadores para incrementar la constante dieléctrica, también se usa como nematocida. Se ha encontrado en pequeñas cantidades en muestras de humo condensado de tabaco, en carnes curadas como el tocino, el pescado salado y ahumado. Asimismo se utiliza como disolvente y en la síntesis del combustible 1-1 dimetilhidrazina. En la figura 10 se muestra la biotransformación de la *N-Nitrosodimetilamina* (DMN) por la interacción del nitrito con dimetilamina y por la acción de bacterias reductoras de nitrato.

Es un agente alquilante, potente carcinógeno (EMS, 1976) induce tumores en diferentes sitios según la ruta de administración, por ejemplo dosis de 25 y 50 ppm de la DMN en la dieta de conejos ocasionan carcinomas hepatocelulares; ratas sometidas a inhalación repetida de la DMN muestran tumores en las cavidades nasales y en el riñón; cuando se administra por vía oral a diferentes líneas de ratones provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón; en *Drosophila* induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan, 1979 a y b). El descubrimiento de la actividad carcinogénica de la DMN ha permitido establecer que los compuestos N-nitroso y otros agentes alquilantes constituyen una clase importante de compuestos carcinogénicos. El contacto humano a agentes alquilantes es exógeno debido al estilo de vida u ocupación y endógeno por la formación de compuestos N-nitrosos dentro del organismo (Laval *et al.*, 1990). En la tabla V se presentan los compuestos utilizados en los tratamientos experimentales.

Fig. 10 Biotransformación de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) (Tomado de Margison y O'connor, 1979).



Pruebas preliminares de toxicidad:

Para seleccionar las concentraciones de la taurina se realizaron pruebas de toxicidad empleando en este trabajo la concentración letal 50 que produce la muerte del 50 % de las moscas tratadas (LC₅₀). El procedimiento se repitió dos veces para confirmar la respuesta. La LC₅₀ para moscas adultas se determinó en 50 mM y se eligieron 5 concentraciones adicionales menores a la LC₅₀ (Tabla V). Para los antagonistas se usaron las mismas concentraciones que la taurina. La concentración de la DMN se seleccionó con base en su potencial mutagénico y recombinogénico en *Drosophila*, en la cual se ha establecido que a 12.5 mM incrementa la frecuencia de mutación y recombinación de manera significativa (Muñoz, 1994).

Tabla. V Compuestos utilizados en los tratamientos experimentales.

Compuestos	Concentraciones [mM]	CAS	Proveedor
N-metil-N-nitosamina (DMN)	12.5	62-75-9	Merck
2-amino etano sulfónico (Taurina)	0.5, 1, 5, 10 y 50	107-35-7	Sigma
β-alanina (β-AL)		107-95-9	UNAM*
Guanidinoetano sulfonato (GES)			UNAM*

* Proporcionados amablemente por la Dra. Pasantes-Morales H. del Instituto de Fisiología Celular. En todos los experimentos se utilizó como disolvente agua destilada.

Elaboración del medio de cultivo para los tratamientos crónicos.

El medio de cultivo fue elaborado con: agua (82.56%), carragenina (0.99%), azúcar (4.62%), harina de maíz (6.94 %), levadura (4.365), ácido propiónico (0.26%) y nipagín (0.26%) (Ramos *et al.*, 1993). Se prepararon las diferentes concentraciones de cada compuesto y se agregaron al medio de cultivo líquido (a 60 °C), removiendo para que la concentración del compuesto fuera homogénea en todo el medio. Se sirvió en frascos lecheros de 250 ml de capacidad y se dejaron solidificar.

Líneas de *Drosophila melanogaster*.

Se utilizaron dos líneas de *D. melanogaster*: *flr³/TM3[In(3LR)-TM3,y⁺ir p^o sep bx^{34e} e^S Ser]*, en notación abreviada *flr³ / TM3, Ser* y *mwh / mwh* de las cuales se extrajeron hembras vírgenes y machos, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron a 25° C y 60% de humedad relativa.

Población de estudio:

- Con el fin de verificar el potencial genotóxico de la taurina y sus antagonistas en células somáticas de las alas, se emplearon larvas de *Drosophila melanogaster* de 24 y 72 h de edad, provenientes de la crusa progenitora: *flr*³ / *TM3, Ser X mwh / mwh*.
- La segunda parte del trabajo consistió en estudiar a la taurina y sus antagonistas en combinación con un mutágeno de referencia N, nitroso dimetilamina (DMN). Las larvas se expusieron a los compuestos de dos maneras diferentes: en una, recibieron un tratamiento crónico de taurina y después un agudo de DMN (protocolo I). En la otra, el orden de los tratamientos se invirtió (protocolo II).

Cruza Progenitora estándar:

Se cruzaron hembras vírgenes *flr*³ / *TM3, Ser* de menos de 72 h de edad con machos *mwh / mwh* de 48 h de edad. Como resultado de esta crusa se obtuvieron dos tipos de progenie: larvas libres de inversión (+ *flr / mwh* +) que constituyeron la mitad de la progenie, la otra mitad fueron larvas portadoras del cromosoma balanceador (*TM3, Ser / mwh* +); debido a que los dos tipos de larvas no son distinguibles se trataron juntas. Los adultos de la F₁ se distinguieron por la forma de las alas, de tipo silvestre para las moscas libres de inversión y con una muesca en el borde de las alas para las portadoras del balanceador, que expresan al marcador *Serrate* (Fig.11).

Diseño experimental

Tres días después de realizada la crusa los progenitores se transfirieron a frascos con medio de cultivo fresco en los que se colectaron huevos por un período de 8 horas (sincronización) con el fin de homogeneizar la edad de la progenie.

Para estudiar el efecto de los compuestos solos o en combinación con el agente alquilante DMN, se utilizaron dos tipos de protocolos:

Protocolo I: los progenitores se sincronizaron en medio de cultivo con las diferentes concentraciones del compuesto a probar (taurina, β -alanina o GES), para el lote testigo, los progenitores se sincronizaron en medio de cultivo libre del compuesto. Posteriormente a las 8 h se retiraron los progenitores dejando

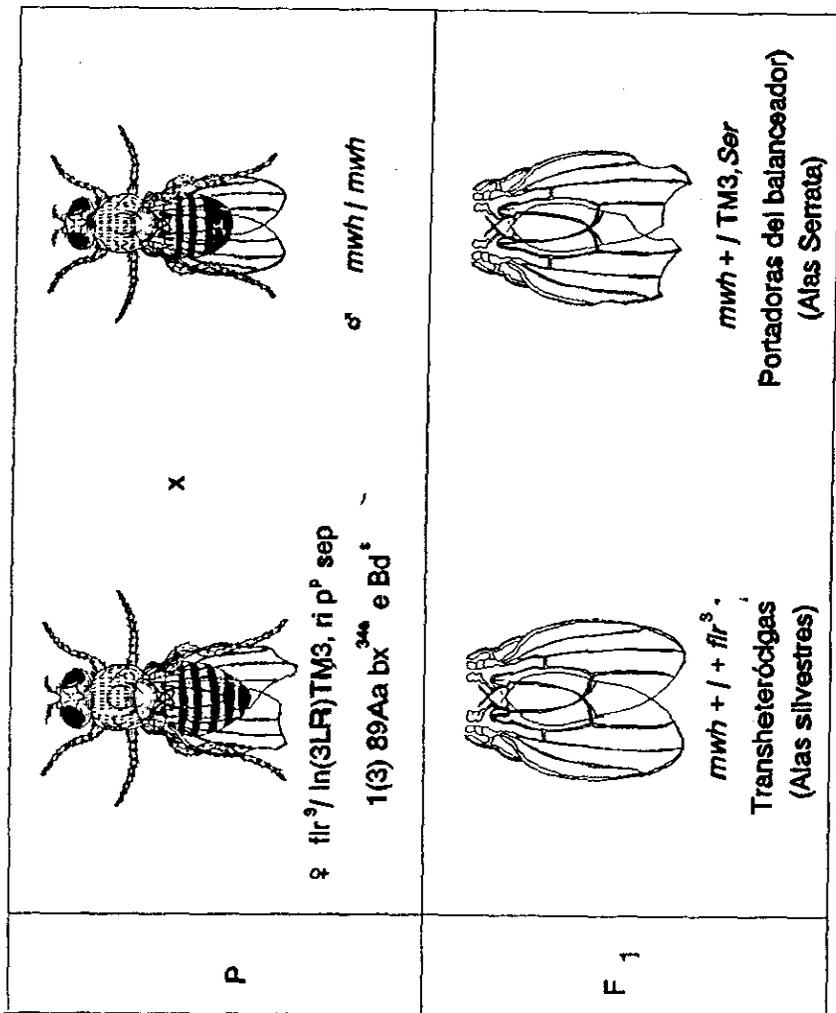
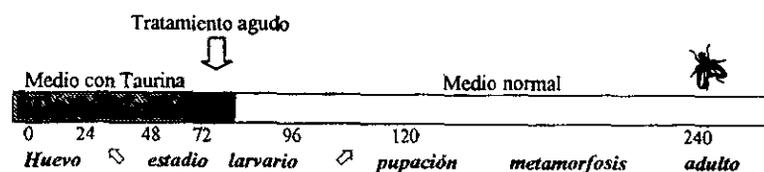


Fig. 11: Cruza progenitora para SMART y fenotipos de las moscas que se obtienen en la F₁ (Tomado de Maldonado, 1994).

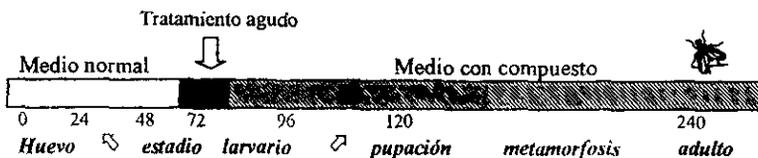
los huevos en el medio hasta que se desarrollaron larvas de 72 ± 4 h de edad, momento en que recibieron un tratamiento agudo, para lo cual se colectaron las larvas mediante una solución concentrada de sacarosa (20%) (Nöthiger, 1970) y se colocaron en tubos homeopáticos que contenían una malla de nylon en un extremo y un tapón de poliuretano en el otro para impedir que las larvas escaparan. Los tubos con las larvas fueron colocados durante 6 h en vasos de precipitados de 10 ml de capacidad que contenían 50 mg de celulosa en polvo (Merck) y 0.3 ml de la DMN [12.5 mM] o agua. Transcurrido este tiempo las larvas se enjuagaron gentilmente con agua corriente y se transfirieron a medio de cultivo fresco hasta la emergencia de los adultos.



Simbología:

 DMN ó Agua
 Taurina, β -alanina ó GES

Protocolo II: Larvas de 72 ± 4 h de edad se extrajeron del medio de cultivo como en el punto anterior y se expusieron de manera aguda (6 h) a una mezcla 1:1 de DMN [12.5 mM] + cada una de las diferentes concentraciones del compuesto a probar, posteriormente se enjuagaron gentilmente con agua corriente y se transfirieron a medio fresco que contenía la concentración correspondiente del compuesto que habían recibido en la mezcla del tratamiento anterior y en el cual permanecieron hasta la emergencia de los adultos.



Simbología:

 Taurina, β -alanina ó GES) + DMN ó Agua
 Taurina, β -alanina ó GES

Procesamiento del material

Se separó la progenie libre de inversión (*mwh +/+ flr3*) con alas de tipo silvestre de las portadoras del cromosoma balanceador (*mwh +/- TM3, Ser*) con alas *Serrate*. Las moscas se sacrificaron por exceso de anestesia y se fijaron en etanol al 70%, posteriormente se elaboraron preparaciones con 20 alas de hembras y 20 alas de machos por laminilla, de acuerdo a Graf *et al.*, (1984).

Registro microscópico de las alas:

Para el registro de las manchas se tomó únicamente la región distal del ala, la cual se subdivide en siete secciones separadas por la venación natural como: a, b, c, c', d, d' y e (García Bellido y Merriam, 1971a y Graf *et al.*, 1984) (Fig. 12), las cuales fueron analizadas a 400X, se registró cada mancha de acuerdo a la sección del ala en la que se encontró, el número de células que la formaban y el tipo de mancha: *mwh*, *flr* o gemela (Fig. 13). Las manchas se clasificaron según el tamaño en: simples chicas (1 a 2 células), simples grandes (> 3 células) o gemelas (si presenta los dos marcadores mutantes *mwh* y *flr* formando parte de la mancha).

Criterios de lectura

Siguiendo la sugerencia Graf *et al.*, (1984) se consideró que dos manchas fueron originadas por procesos independientes si se encontraban separadas por 3 o más hileras de tricomas de tipo silvestre.

Análisis estadístico:

Se compararon las frecuencias obtenidas para manchas simples chicas y grandes y para manchas gemelas en los lotes testigo y experimentales mediante el procesamiento de decisión múltiple de Frei y Würigler (1988) basado en la prueba de X^2 para proporciones y con un nivel de significación del ensayo del 5%. En este procedimiento se contrastan dos hipótesis y el diagnóstico obtenido califica la actividad genotóxica del tratamiento, el diagnóstico puede ser: positivo, débil positivo, indeterminado o negativo. La hipótesis nula (H_0) postula que no hay diferencias entre la frecuencia de mutación de las series

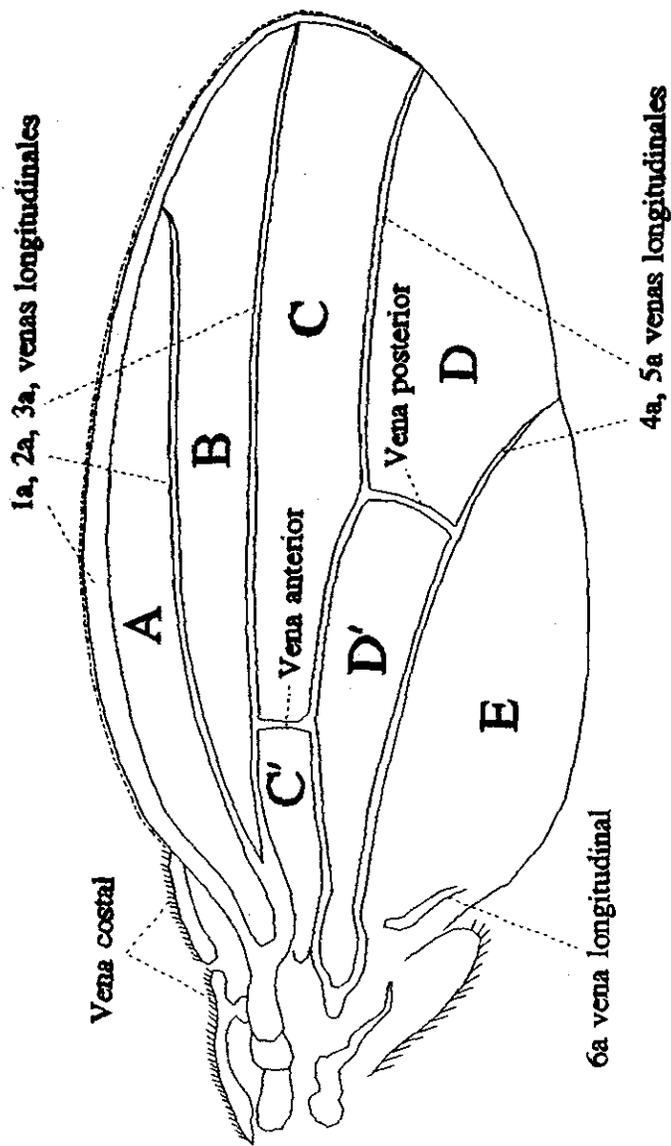
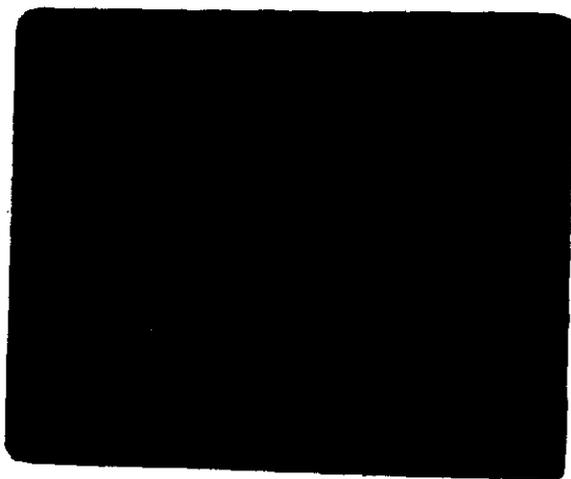
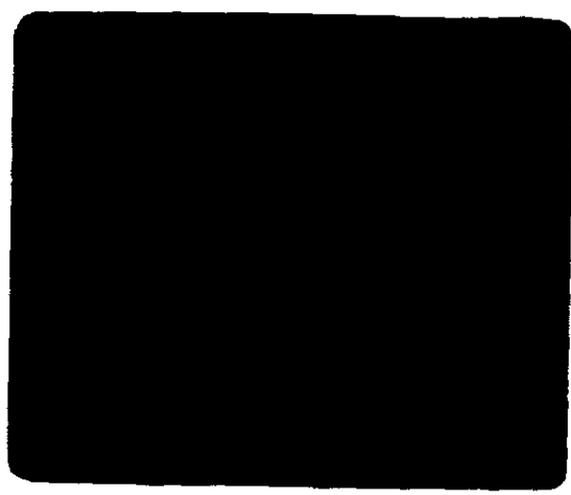


Fig. 12 Zonas del ala utilizadas para el registro de manchas (Tomado de Maldonado, 1994).

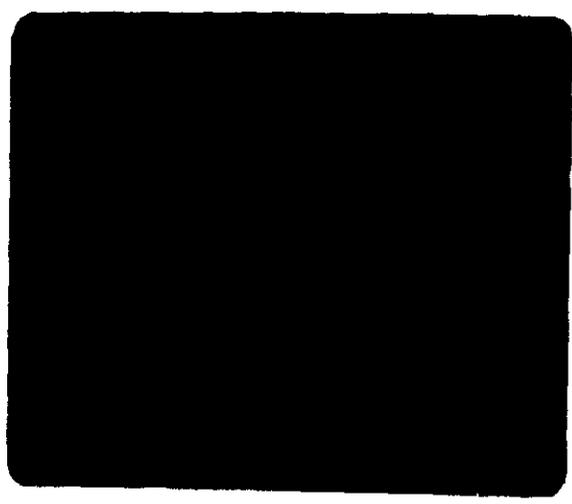
Fig. 13 Tipo de manchas recobradas en la prueba de SMART; a) mancha *mwh*; b) mancha gemela y c) mancha *flr* (aumento 400 X).



a



b



c

testigo y las tratadas. El rechazo de la hipótesis nula indica que hay un incremento estadístico en la frecuencia de mutación basal. La hipótesis alternativa (H_a) postula que el tratamiento resulta en un incremento estadístico de la frecuencia de mutación de las series tratadas equivalentes a m veces la frecuencia basal. Esta H_a es rechazada si la frecuencia de mutación es *significativamente menor* que el incremento postulado. El rechazo indica que el tratamiento no produce el aumento requerido para considerarlo significativo bajo las condiciones probadas.

El incremento estadístico se traduce en m , que es el número de veces que se aumenta la frecuencia de mutación del lote testigo. Con base en la alta frecuencia de aparición de manchas sencillas chicas y las manchas totales, $m=2$; y para manchas grandes y gemelas, $m=5$ ya que éstas son mucho menos frecuentes que las primeras. Este análisis permite decidir si el resultado obtenido para cada compuesto es positivo, si se rechaza la H_0 y se acepta H_a ; negativo, si se acepta H_0 y se rechaza H_a ; débil positivo, si se rechazan ambas hipótesis; e indeterminado, si se aceptan ambas (Frei y Würzler, 1988) (Tabla VI).

Tabla VI. Resultados posibles en la SMART. H_0 = hipótesis nula, H_A = hipótesis alternativa (Según Frei y Würigler, 1988).

H_A	Se rechaza H_A	Se acepta H_A
H_0	Se acepta H_0	Se rechaza H_0
	Indeterminado (i)	Negativo (-)
	Positivo (+)	Débil positivo (w)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dada la versatilidad del sistema de prueba SMART de *Drosophila melanogaster* es posible utilizar a este organismo como modelo de bioensayo (Graf y Singer, 1984) ya que ha mostrado ser confiable en la caracterización de la genotoxicidad y/o actividad protectora en diversos compuestos (Muñoz, 1994).

En el presente trabajo se seleccionaron dos edades larvarias (24 y 72 h de edad) debido a que el metabolismo puede ser diferente según la edad de la larva al momento del tratamiento, de tal manera que las larvas de 24 h, que se encuentran al principio del desarrollo, el número de células blanco es menor que en las larvas de 72 h. Sin embargo la cantidad de divisiones celulares que transcurren hasta la metamorfosis es mayor en las larvas de 24 h que en las de 72 h de edad (Tabla I).

Taurina:

La tabla VII muestra la frecuencia de manchas obtenidas al tratar larvas de primer estadio con taurina durante 48 h. Sólo a 10 y 50 mM la taurina incrementó la frecuencia de manchas simples grandes ($P < 0.05$). En el resto de las concentraciones la frecuencia de manchas fue similar o menor a la del lote testigo, siendo éstas *mwh*, (excepto una). No obstante lo anterior, el promedio de ciclos de división se incrementó con respecto al del lote testigo (1.67). En la figura 14a se observa que a partir de 1 mM, la frecuencia de manchas simples chicas disminuyó conforme aumentó la concentración, aunque al sumar todas las manchas no se observaron incrementos significativos. La figura 14b detalla el tiempo de inducción de las manchas. Es importante notar que a partir de 5 mM el tiempo de inducción ocurrió aproximadamente 24 h antes que en el lote testigo, tomando como base que la duración del ciclo celular se ha calculado en 8 h (Szabad *et al.*, 1983). Al analizar la distribución de manchas por mosca no se encontraron modificaciones importantes con respecto a la serie testigo (Fig. 14c).

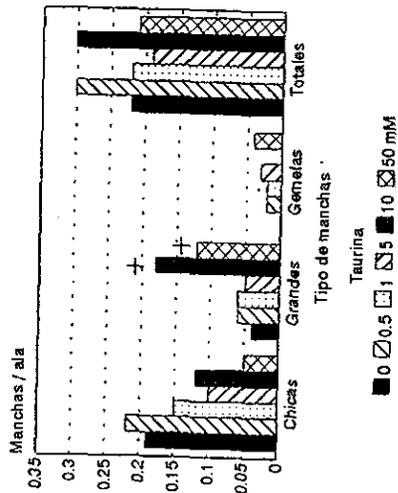
La administración de taurina a larvas de 72 h de edad arrojó resultados diferentes (Tabla VIII y Fig. 16a). Todas las series experimentales mostraron una frecuencia de manchas totales similar a la serie testigo, y a 0.5 y 50 mM éstas fueron incluso menores; el número promedio de ciclos de división celular de las manchas recobradas fue también similar al testigo (1.67), siendo un poco mayor a 50 mM. La figura 16b muestra que el incremento en esta concentración corresponde aunque en una frecuencia baja, con la aparición de manchas de

Tabla VII. Manchas / ala inducidas con diferentes concentraciones de taurina en larvas de 24 h de edad.
Exposición: 24 X 48 (Taurina) X 6 h (agua destilada o DMN)

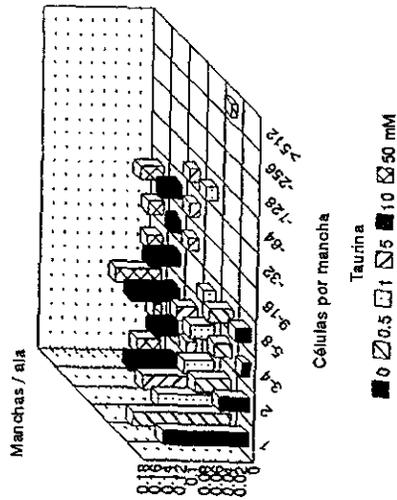
Compuesto [mM]	Número de alarvas analizadas	Número de manchas				Porcentaje de manchas	Protección de división celular	Frecuencia de divisiones X10 ⁵
		Simplex perinas (62cel) (m=2)	Simplex grande (23cel) (m=5)	Gemelas (m=5)	Totales (m=2)			
Agua destilada	80	0.19 (15)	0.04 (3)	0.0 (0)	0.22 (18)	0.0	1.67	0.9
0.5	100	0.22 (22)	0.06 (6)	0.02 (2)	0.30 (30)	0.0	2.03	1.2
1	54	0.15 (8)	0.06 (3)	0.02 (1)	0.22 (12)	0.0	2.25	0.9
5	58	0.10 (6)	0.05 (3)	0.03 (2)	0.19 (11)	0.0	2.55	0.8
10	74	0.12 (9)	0.18 (13)	0.00 (0)	0.30 (22)	0.01 (1)	2.81	1.2
50	80	0.05 (4)	0.12 (10)	0.04 (3)	0.21 (17)	0.0	3.29	0.9
DMN [12.5 ppm]	142	2.05 (291)	2.35 (333)	0.39 (55)	4.78 (679)	3.80 (540)	2.90	17.2
0.5	52	1.33 (69)	1.94 (101)	0.44 (23)	3.71 (193)	2.56 (133)	3.06	12.3
1	40	3.10 (124)	4.32 (173)	1.25 (50)	8.68 (347)	4.87 (195)	2.82	25.1
5	40	3.85 (154)	3.65 (146)	0.77 (31)	8.27 (331)	6.1 (244)	2.45	28.2
10	40	3.67 (147)	3.65 (146)	1.00 (40)	8.32 (333)	6.65 (266)	2.63	31.4
50	40	2.85 (114)	3.28 (131)	1.05 (42)	7.18 (287)	4.75 (190)	2.55	23.8

Análisis estadístico de acuerdo a Frey y Würgler (1988): +, positivo; w, débil positivo; i, indeterminado; p=0.05.

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células/ mancha



c) Número de manchas por mosca.

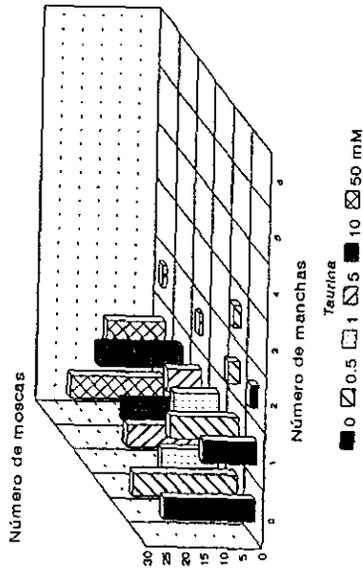
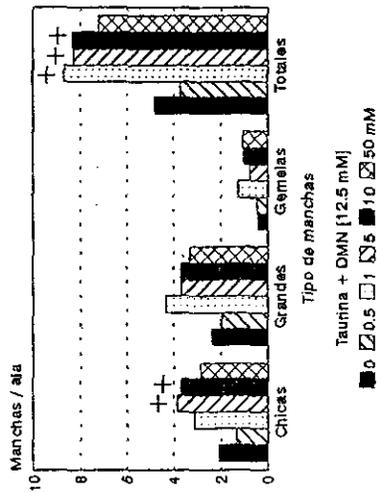
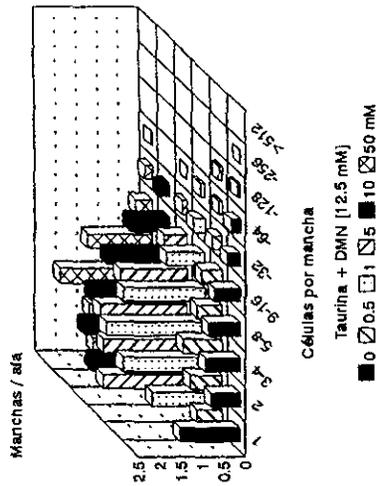


Fig. 14 Manchas por ala inducidas por taurina en larvas (*mwh* +/+ *flr*) de 24 h de edad.

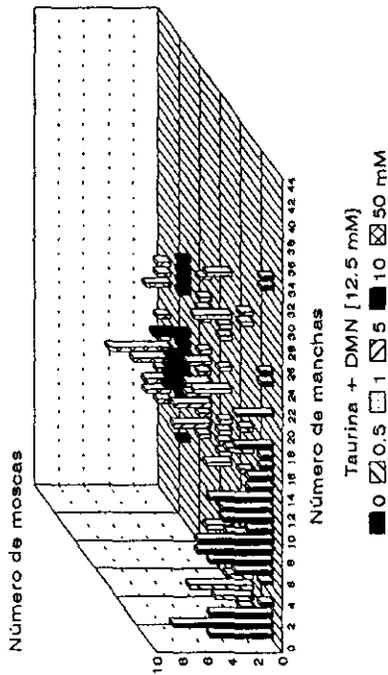
a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca.



56 Fig. 15 Manchas por ala inducidas por taurina + DMN en larvas (*mwh* +/+ *flr*) de 24 h de edad.

mayor tamaño. El análisis de la distribución del número de manchas por mosca tampoco fue diferente a la de la serie testigo (Fig. 16c).

Taurina + DMN

La DMN es un compuesto alquilante que induce de manera significativa todo tipo de manchas, con una frecuencia 22 veces mayor (4.78) que la frecuencia basal (0.22) ($P < 0.001$) (Tabla VII).

El tratamiento con la taurina (48 h) seguido por el tratamiento con la DMN (6h) [protocolo I] administrado a larvas de 24 h (Tabla VII y Fig. 15a), incrementó la frecuencia de manchas totales en todas las concentraciones de manera significativa ($P < 0.05$) y en forma débil positiva a 50 mM. Al analizar el efecto por tipo de mancha se obtuvo que éste fue significativo para manchas chicas a 5 y 10 mM y débil positivo a 1 y 50 mM. Para las manchas simples grandes y en las gemelas el efecto fue débil positivo en todas las concentraciones de la taurina. La mayor inducción de clones por 10^{-5} células se obtuvo a 10 mM (31.4). La distribución del número de células por mancha mostró una dispersión similar a la obtenida sólo con la DMN, aunque con frecuencias mayores (Fig. 15b). Una dispersión también menor se obtuvo para la cantidad de manchas por mosca, aunque a partir de 1 mM, la distribución se desplazó a la derecha de la recobrada para la DMN (Fig. 15c).

En larvas de 72 h, el tratamiento con la DMN + la taurina (6h) seguido por el de la taurina (48 h) [protocolo II] (Tabla VIII y Fig. 17a), incrementó la frecuencia de manchas totales inducidas por la DMN a todas las concentraciones de taurina ($P < 0.05$), sólo a 5 mM el incremento en la frecuencia de manchas chicas resultó débil positivo, al igual que la frecuencia de manchas simples grandes a todas las concentraciones de taurina. La frecuencia de manchas gemelas aumentó incrementada de manera significativa a 0.5 mM y en forma débil positiva en el resto de las concentraciones de taurina. El número promedio de divisiones celulares fue ligeramente mayor a 5 mM, encontrándose la frecuencia mas elevada de inducción de clones $\times 10^{-5}$ células a 0.5 mM. Al clasificar a las manchas como *nwh* o *flr* se encontró que el efecto de la taurina abarcó a los dos tipos de manchas. La figura 17b muestra la distribución del número de células por mancha, a partir de 5 mM, la dispersión en la distribución fue mayor que la obtenida en el tratamiento con la DMN, lo que indica que la inducción de las manchas también ocurrió en una edad más temprana y con una frecuencia notoriamente mayor que la obtenida para el mutágeno seleccionado. La figura 17c, muestra la distribución del número de manchas por mosca, en la que la dispersión con el doble tratamiento

fue también mas alta que para la DMN, y también se encuentra a la derecha, es decir predomina un mayor número de manchas por mosca. Es interesante el hecho de que a pesar del tratamiento, hubo moscas que no presentaron manchas en sus alas y alternativamente algunas llegaron a mostrar más de 40 manchas (10 mM). Adicionalmente se observaron alteraciones en la expresión de la mutación *mwh* (que produce más de 2 tricomas por célula), los tricomas tenían un tamaño notablemente reducido y se evidenciaron en un mayor número (más de 10 por célula) (Fig 18a). La variación en la expresividad de la mutación *flr* (flama) también fue incrementada, encontrándose desde sólo una mancha quitinosa hasta formaciones globosas (Fig.18b); además, la frecuencia de manchas *mwh* y *flr* aumentó notablemente en ambos protocolos (Tablas VII y VIII).

Los resultados obtenidos en el ensayo SMART indican que la taurina *per se* no es genotóxica en larvas de 24 y 72 horas, pero cuando se administra la taurina antes o en cotratamientos con el mutágeno (DMN) potencia el daño causado por la DMN, este efecto fue más evidente en los experimentos con larvas de tercer estadio (72 h). En ambos protocolos se recobró una frecuencia importante de manchas chicas lo que sugiere que parte del daño genotóxico es provocado en las últimas etapas del desarrollo de las larvas, lo que podría deberse a dos posibilidades: 1) la desintoxicación de la taurina y/o la mezcla (taurina + DMN) produce un metabolito más reactivo, o bien, 2) las manchas chicas son provocadas por daño secundario, probablemente de naturaleza oxidante, lo que se ha mostrado en el caso de la DMN (Muñoz, 1994).

Es importante señalar que los resultados obtenidos en el presente estudio no coinciden con los encontrados por diferentes grupos de investigación que le atribuyen a la taurina un papel protector que neutraliza radicales libres (Laidlaw *et al.*, 1989; Cozzi *et al.*, 1995). Con base en lo anterior, surge la interrogante ¿el extremo amino o el carboxilo de la taurina contribuye a la inducción del daño genotóxico? Diversos reportes indican que los grupos sulfatos (SO₄) se utilizan en la célula para secretar algunas sustancias como proteínas al medio externo celular, las enzimas relacionadas con estos procesos de sulfatación aparentemente utilizan en algunos casos aminoácidos azufrados como sustratos, entre ellos la cisteína, por lo que la taurina y sus derivados podrían estar participando al menos indirectamente en el aporte de grupos sulfatos (SO₄) (Cañas y Valenzuela, 1991)

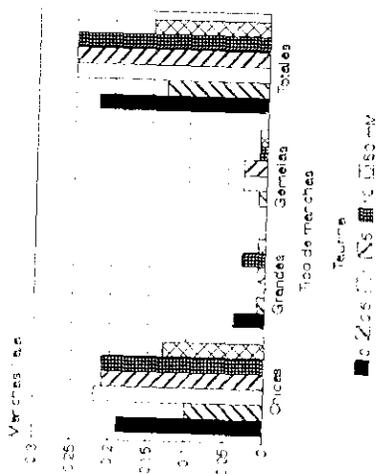
Para determinar la participación de los extremos terminales de la taurina se seleccionaron dos compuestos estructuralmente semejantes que fueron

Tabla VIII. Manchas / ala inducidas con diferentes concentraciones de taurina en larvas de 72 h de edad.
 Exposición: 72 X 6 (Taurina + agua destilada o DMN) X 48 (Taurina)

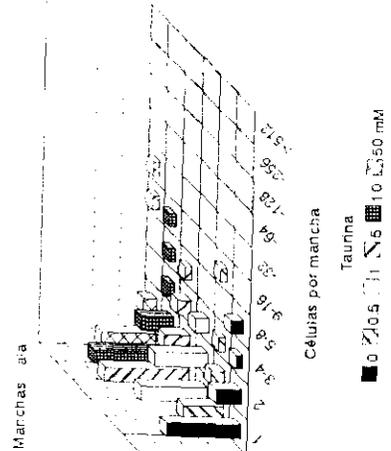
Compuesto [mM]	Número de larvas analizadas	Survival (%)		Pupal weight (mg)		Pupal length (mm)		Pupal sex ratio	Pupal emergence (%)	Pupal emergence time (h)
		Control	Taurina	Control	Taurina	Control	Taurina			
Agua destilada	80	0.19 (15)	0.04 (3)	0.0 (0)	0.22 (18)	0.22 (18)	0.0	0.0	1.67	0.9
0.5	78	0.10 (8)	0.01 (1)	0.01 (1)	0.13 (10)	0.12 (9)	0.0	0.0	1.70	0.5
1	80	0.22 (18)	0.00 (0)	0.03 (2)	0.25 (20)	0.22 (18)	0.0	0.0	1.50	1.0
5	80	0.21 (17)	0.01 (1)	0.03 (2)	0.25 (20)	0.22 (18)	0.0	0.0	1.35	1.0
10	80	0.21 (17)	0.03 (2)	0.01 (1)	0.25 (20)	0.24 (19)	0.0	0.0	1.60	1.0
50	78	0.13 (10)	0.01 (1)	0.01 (1)	0.15 (12)	0.14 (11)	0.0	0.0	1.83	0.6
DMN	142	2.05 (291)	2.35 (333)	0.39 (55)	4.78 (679)	3.80 (540)	0.59 (84)	2.90	2.90	17.2
12.5 ppm	72	4.92 (354) +	4.24 (305) w	1.61 (116) +	10.76 (775) +	7.32 (527)	1.83 (132)	2.54	2.54	36.6
1	76	4.17 (317) +	5.37 (408) w	0.82 (62) w	10.36 (787) +	6.13 (466)	3.41 (259)	2.59	2.59	28.5
5	80	3.08 (246) w	6.18 (494) w	0.75 (60) w	10.00 (800) +	6.91 (553)	2.34 (187)	3.31	3.31	31.4
10	93	3.92 (365) +	6.15 (572) w	1.05 (98) w	11.13 (1035) +	7.31 (680)	2.76 (257)	2.91	2.91	34.3
50	104	3.32 (345) +	5.41 (563) w	1.12 (116) w	9.85 (1024) +	5.94 (618)	2.79 (290)	2.96	2.96	29.0

Exposición: 72 X 6 (Taurina + DMN) *
 Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988). +, positivo; w, débil positivo; i, indeterminado; P=0.05.

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca.

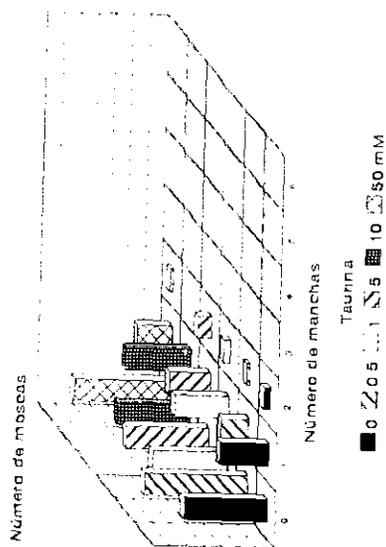
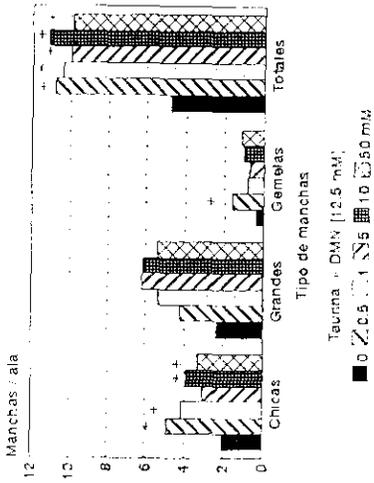
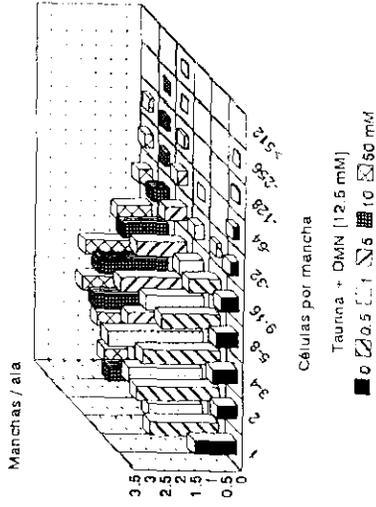


Fig. 16 Manchas por ala inducidas por taurina en larvas (*mwh* ++ *flr*) de 72 h de edad.

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca.

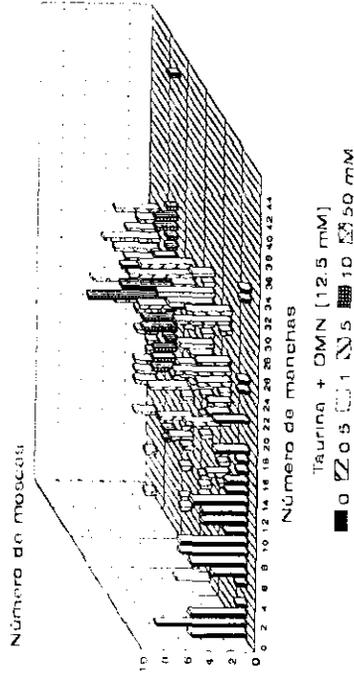
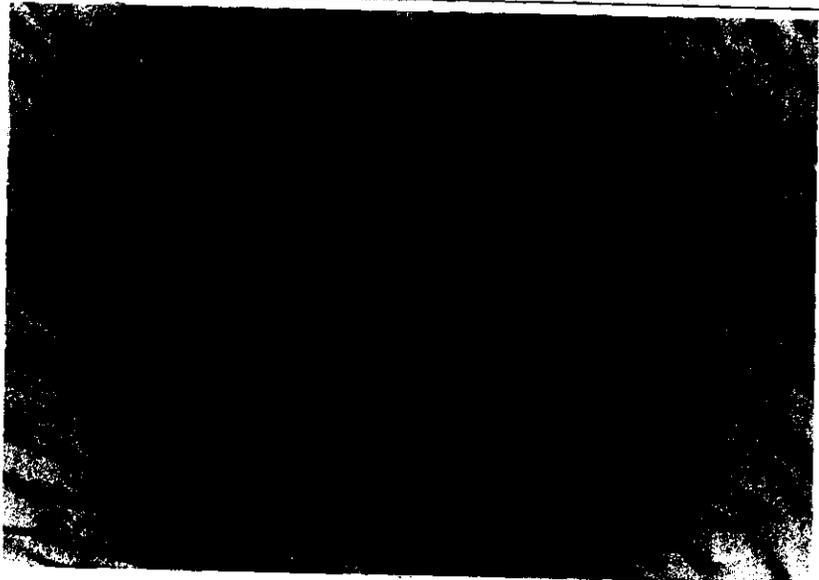
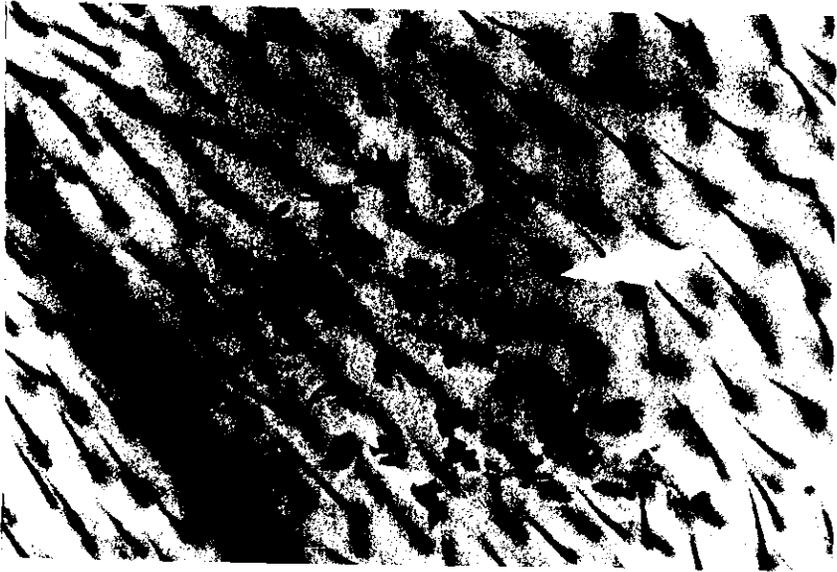


Fig. 17 Manchas por ala inducidas por taurina + DMN en larvas (rowh +/+ flr) de 72 h de edad.

Fig. 18 alteraciones inducidas por la mezcla (Taurina + DMN) en larvas de 72 h de edad en *Drosophila melanogaster* en la expresión de *mwh* (a) y *flr* (b).



a



b

probados en las mismas concentraciones: la β -alanina y el Guanidinoetano sulfonato (GES), que difieren de la taurina en el extremo carboxil o amino, respectivamente (Fig. 9).

β - alanina:

En larvas de 24 h, la β -alanina no incrementó la frecuencia de manchas chicas, grandes o gemelas, sin embargo, al sumar todas las manchas se observó un ligero incremento a 10 y 50 mM (Tabla IX y Fig. 19a), sólo indujo 1 mancha de tipo *flr* a 5 mM y el número promedio de divisiones celulares que originaron a las manchas recobradas fue similar al del testigo. La dispersión de la distribución del número de células por mancha y de manchas por mosca fue semejante a la del grupo testigo (Figuras 19b y c). En larvas de 72 h, la β -alanina elevó ligeramente la frecuencia de manchas chicas a 0.5 mM, la de manchas grandes a 50 mM y la de manchas totales a 0.5, 10 y 50 mM (Tabla X y Fig. 21a). Sólo a 50 mM provocó 1 mancha de tipo *flr* y el número de ciclos celulares promedio que originó a las manchas recobradas fue algo mayor al del testigo a 10 y 50 mM. La dispersión de la distribución del número de células por mancha fue mas alta a la del lote testigo (Fig. 21b) debido a la aparición de manchas de mayor tamaño. La dispersión en la distribución del número de manchas por mosca no mostró diferencias con respecto a la del grupo testigo (Fig. 21c).

Cuando las larvas se expusieron inicialmente a un tratamiento crónico con β -alanina y posteriormente a la DMN, se incrementó la frecuencia de manchas totales a 1 y 10 mM ($P < 0.05$) y el efecto a 50 mM fue débil positivo (Tabla IX y Fig. 20a). A diferencia del tratamiento con la taurina, la frecuencia de manchas chicas fue menor a la inducida por la DMN en todas las concentraciones de β -alanina. Las manchas grandes se presentaron en mayor número aunque el diagnóstico fue de un efecto débil positivo. Las manchas gemelas se incrementaron a 10 mM ($P < 0.05$) y sólo ligeramente a 50 mM. En todas las concentraciones se indujeron manchas de tipo *mwh* y *flr*. La cantidad de ciclos celulares se elevó respecto al testigo positivo y la máxima producción de manchas se obtuvo a 1 mM (28.7). La figura 20b muestra la dispersión en el número de células por mancha, la cual fue distinta a la de la DMN ya que se recobraron más manchas de mayor tamaño (3-64 células), la forma de la curva sugiere una posible relación con el tiempo de vida media del compuesto genotóxico. La dispersión de la distribución del número de manchas por mosca fue menor a 1 mM y mayor a 50 mM, sin embargo, la escasa dispersión en la

concentración 1 mM de β -alanina debe tomarse con reserva ya que el número de moscas recobradas para el análisis fue bajo, por lo que es probable que al aumentar el tamaño de muestra se obtuviera un patrón semejante al de 50 mM, sin embargo es necesario comprobar experimentalmente lo anterior. En los tratamientos con la β -alanina se observó una oviposición baja, retraso de la etapa larvaria y muerte en el estadio pupal por lo cual se recobraron pocos organismos a 1, 10 y 50 mM y ninguno a 0.5 y 5 mM. Debido a que no se contó con un número de moscas satisfactorio para realizar el análisis estadístico, los datos no se incluyen en la tabla. La falta de correspondencia entre la concentración de la β -alanina y la toxicidad encontrada sugiere la participación de mecanismos de desintoxicación alternativos que son estimulados según la intensidad del tratamiento y que presentan puntos específicos de saturación, los que una vez alcanzados podrían inducir la respuesta de otros componentes del proceso de eliminación de genotóxicos (Abundis, 1997). Otra posibilidad es que el metabolismo inmaduro de la larva de primer estadio sea deficiente en algún componente enzimático requerido en el proceso de desintoxicación ya que el tratamiento a estas concentraciones en larvas de 72 h no fue tan tóxico y si se recobraron organismos en todas las concentraciones, sin embargo en 10 mM el tamaño de muestra está muy por debajo del mínimo recomendado. Por lo que estos datos no son incluidos en la tabla.

La tabla X y la figura 22a muestran los resultados obtenidos con larvas de tercer estadio tratadas con la mezcla de β -alanina + DMN y posteriormente con β -alanina hasta la pupación.

Al igual que en el tratamiento a larvas de 24 h, la frecuencia de manchas chicas fue menor que la del testigo positivo, a excepción de 5 mM que fue igual a la de la DMN. La frecuencia de manchas grandes fue incrementada a partir de 5 mM, (aunque el tamaño de muestra fue bajo) siendo el orden de inducción: 5 > 10 > 50 mM, lo que podría estar en relación con la toxicidad del tratamiento. Con respecto a la frecuencia de las manchas gemelas, ésta se incrementó ligeramente a 5 mM. Al sumar todas las manchas se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) a 5 mM, seguido por un incremento menor a 10 mM y finalmente a 50 mM. La misma tendencia se observó al clasificar las manchas en tipo *mwh* y tipo *flr*. El número promedio de ciclos de división celular fue mayor en todas las series expuestas a DMN + β -alanina que en el tratamiento con a la DMN y la mayor inducción de clones por 10^{-5} células se recobró a 5 mM de β -alanina (29.5). La dispersión en el número de células por mancha fue similar a la del testigo positivo pero con frecuencias más altas para las manchas

de 3 a 64 células (Fig. 22b). La dispersión en el número de manchas por mosca fue menor a 0.5 y 1 mM con un desplazamiento de los valores a la izquierda, es decir, las moscas expuestas presentaron hasta 13 manchas en sus alas y hubo moscas que no mostraron manchas (Fig. 22c). A partir de 10 mM la dispersión fue similar a la de la DMN y a 50 mM llama la atención la presencia de 7 moscas que no mostraron manchas en sus alas, mientras que otras presentaron hasta 30. Es probable que esta gran dispersión se relacione con la capacidad de desintoxicación de los diferentes organismos. La respuesta en larvas de primer y tercer estadio fue similar en relación con este aspecto. En ambos casos la mayor inducción de manchas de 3 a 64 células sugiere que durante este tiempo del desarrollo la actividad genotóxica es mayor y probablemente después decae, ya sea por eliminación o porque la vida media del metabolito sea corta.

Es importante resaltar la aparición de alteraciones en la diferenciación de las alas como la presencia de venas extras y la inducción de crecimientos abultados en la superficie, sin embargo no se cuantificó el total de eventos ya que el ensayo SMART no está diseñado para evaluar su presencia, sin embargo éstas se manifestaron reiteradamente en las series experimentales. Además se encontró una estructura ectópica sobre la superficie del ala, la cual por su apariencia es semejante a un ojo compuesto de la mosca, en el que se aprecia con claridad formaciones semejantes a las omatidias, esto sugiere que la combinación de la β -alanina + la DMN de alguna manera interactúan con los genes homeóticos (Fig. 23), sin embargo la comprobación de esta actividad requiere de experimentación adicional, con una metodología específica para analizar este tipo de efectos.

Guanidinoetano sulfonato (GES):

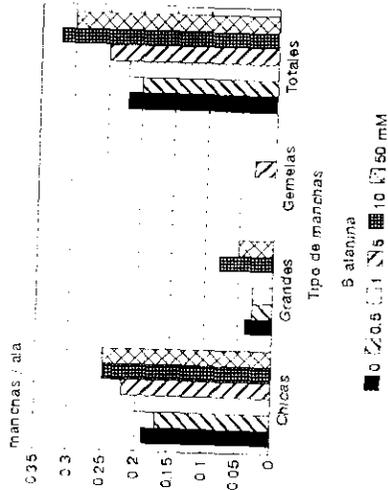
La determinación de la genotoxicidad del GES no pudo llevarse al cabo por no disponer de suficiente cantidad del compuesto. En larvas de 24 h de edad expuestas a GES y posteriormente con un tratamiento agudo con la DMN (6 h), resultó significativo el incremento de manchas totales sólo a 1 mM. Curiosamente, la frecuencia de manchas a 0.5 mM de GES fue similar a los valores basales de mutación y recombinación somáticas, es decir, en ausencia de la DMN (Tabla XI y Fig. 24a). La frecuencia de manchas chicas (0.22), grandes (0.05), gemelas (0.0) y totales (0.28) corresponden a un testigo negativo (para un tamaño de muestra semejante) La magnitud de las frecuencias recobradas podría sugerir que esta concentración protege del daño genotóxico de la DMN, sin embargo sería necesario repetir nuevamente este experimento para obtener un número de moscas suficientes para realizar el

Tabla IX. Manchas / ala inducidas con diferentes concentraciones de β -alanina en larvas de 24 h de edad.
Exposición: 24 X 48 (β -alanina) X 6 (agua destilada o DMN)

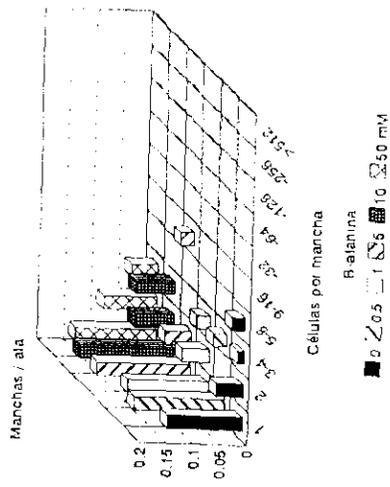
Compuesto [μ M]	Número de larvas adulteras	Simple frequency (%)		Simple frequency (%)		Porcentaje de manchas m/h	Promedio del número de ciclos de oviposición día/larva	Frecuen- cia de ciclos de oviposición
		0-2	3-5	0-2	3-5			
Agua destilada	80	0.19 (15)	0.04 (3)	0.0 (0)	0.22 (18)	0.22 (18)	0.0	0.9
0.5	40	0.17 (7)	0.03 (1)	0.0 (0)	0.20 (8)	0.20 (8)	0.0	0.8
1	40	0.20 (8)	0.03 (1)	0.0 (0)	0.22 (9)	0.22 (9)	0.0	0.9
5	40	0.22 (9)	0.00 (0)	0.03 (1)	0.25 (10)	0.22 (9)	0.03 (1)	1
10	40	0.25 (10)	0.08 (3)	0.0 (0)	0.32 (13)	0.32 (13)	0.0	1.3
50	40	0.25 (10)	0.05 (2)	0.0 (0)	0.30 (12)	0.30 (12)	0.0	1.2
DMN [12.5 ppm]	142	2.05 (291)	2.35 (333)	0.39 (55)	4.78 (679)	3.80 (540)	0.59 (84)	2.90
1	20	1.75 (35)	6.10 (122) w	0.40 (8)	8.25 (165) +	6.60 (132)	1.25 (25)	28.7
50	40	1.62 (65)	5.22 (209) w	0.68 (27) w	7.53 (30) w	5.22 (209)	1.62 (65)	24.2

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

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca.

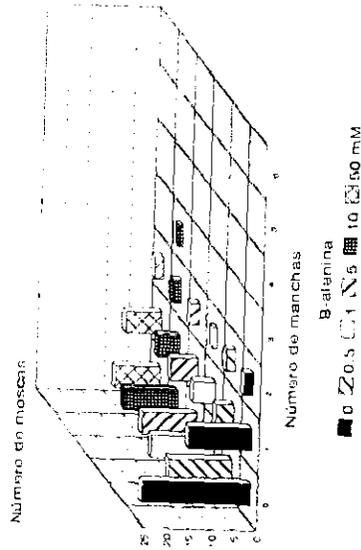
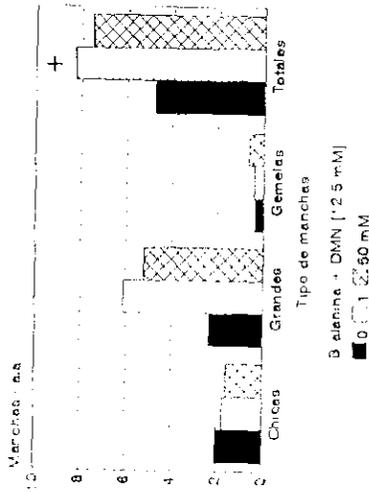
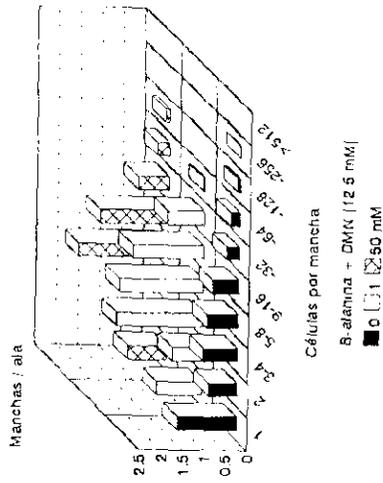


Fig. 19 Manchas por ala inducidas por B-alanina en larvas (*mwh* +/+ *flr*) de 24 h de edad.

a) Tipo de manchas por ala



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca

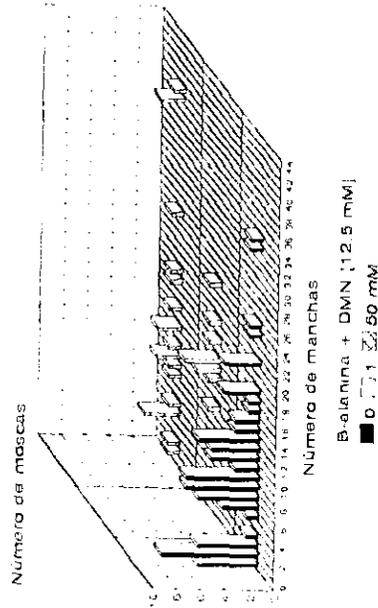


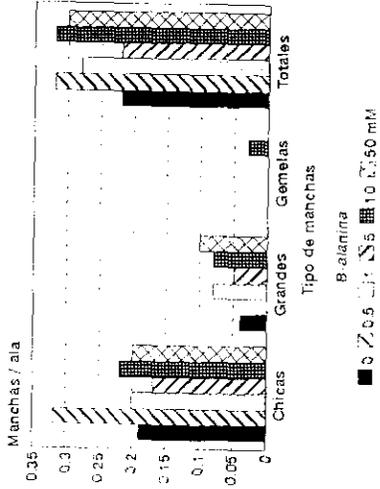
Fig. 20 Manchas por ala inducidas por B-alanina + DMN en larvas (*mwh +/+ flr*) de 24 h de edad.

Tabla X. Manchas / ala inducidas con diferentes concentraciones de β -alanina en larvas de 72 h de edad.
 Exposición: 72 X 6 (β -alanina + agua destilada o DMN) X 48 (β -alanina)

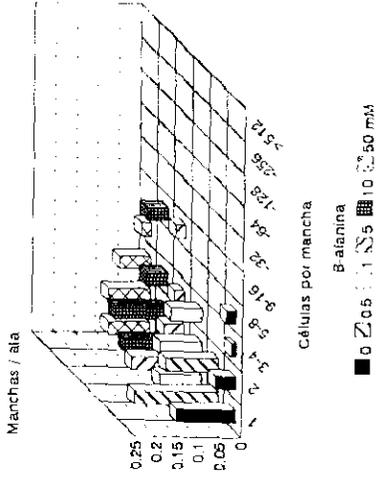
Complejo [μ M]	Número de larvas	Número de manchas		Proporción de manchas	Proporción de larvas manchadas	Número de manchas	Proporción de manchas	Número de manchas	Proporción de manchas
		Stimulo positivo (β -Ala)	Stimulo negativo (Agua)						
Agua destilada	80	0.19 (15)	0.04 (3)	0.0 (0)	0.22 (18)	0.22 (18)	0.0	1.67	0.9
0.5	40	0.32 (13)	0.00 (0)	0.0 (0)	0.32 (13)	0.32 (13)	0.0	1.38	1.3
1	40	0.20 (8)	0.08 (3)	0.0 (0)	0.28 (11)	0.28 (11)	0.0	1.91	1.1
5	40	0.17 (7)	0.05 (2)	0.0 (0)	0.22 (9)	0.22 (9)	0.0	1.89	0.9
10	40	0.22 (9)	0.08 (3)	0.03 (1)	0.32 (13)	0.30 (12)	0.0	2.23	1.3
50	40	0.20 (8)	0.10 (4)	0.0 (0)	0.30 (12)	0.28 (11)	0.03 (1)	2.0	1.1
DMN [12.5 ppm]	142	2.05 (291)	2.35 (333)	0.39 (55)	4.78 (679)	3.80 (540)	0.59 (84)	2.90	17.2
0.5	40	1.02 (41)	1.40 (56)	0.25 (10)	2.67 (107)	2.10 (84)	0.32 (13)	3.17	9.6
1	40	1.20 (48)	2.08 (83)	0.32 (13)	3.60 (144)	2.58 (103)	0.70 (28)	3.25	11.9
5	22	2.19 (46)	6.48 (136) w	0.90 (19) w	9.57 (201) +	6.29 (132)	2.38 (50)	3.50	29.5
10	40	1.45 (58)	4.90 (196) w	0.45 (18)	6.80 (272) w	5.10 (204)	1.25 (50)	3.79	22.8
50	40	1.30 (52)	3.92 (157) w	0.45 (18)	5.68 (227)	4.20 (168)	1.02 (41)	3.60	19.1

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

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca.

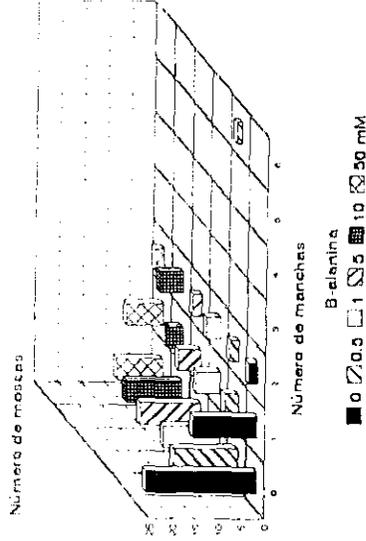
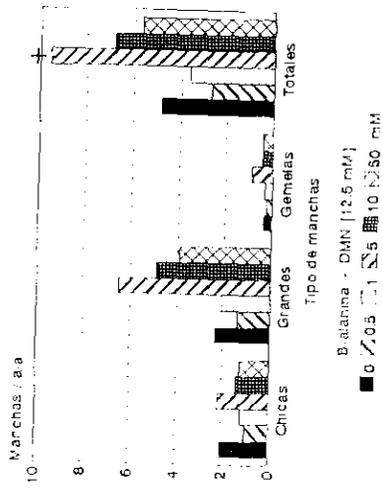
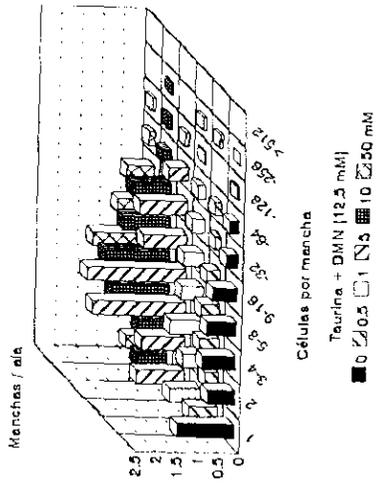


Fig. 21 Manchas por ala inducidas por B- alanina en larvas (*mwh* +/+ *flr*) de 72 h de edad.

a) Tipo de manchas por ala



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca

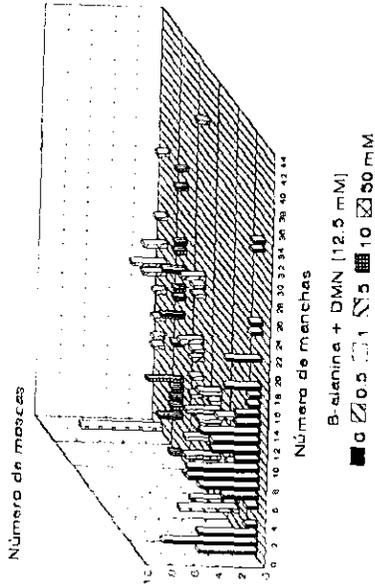


Fig. 22 Manchas por ala inducidas por B-alanina + DMN en larvas ($mwh +/+ ftr$) de 72 h de edad.

Fig. 23 Formación de un ojo ectópico en la superficie del ala de *Drosophila melanogaster*.



análisis estadístico para verificar la respuesta observada, lo cual no fue posible por la falta de suficiente GES. A 1 mM, la frecuencia de manchas grandes se incrementó al triple de la obtenida con la DMN y se duplicó también la de manchas gemelas. En total, la suma de las manchas fue el doble de las producidas por la DMN (9.75) ($P < 0.05$) e incluyó tanto manchas de tipo *mult* como *flr*. Comparado con el testigo positivo, a 5 y 10 mM la frecuencia de manchas chicas fue menor (1.80 y 0.87, respectivamente), la de grandes fue similar y la de gemelas ligeramente menor. La suma de las manchas reveló valores similares a los del tratamiento con la DMN. Con 1 mM el número de ciclos de división promedio que generaron las manchas recobradas fue mayor, así como la cantidad de manchas se recobró a 1 mM (33.2). La figura 24b, muestra que aunque la dispersión en la distribución del número de células por mancha fue similar a la del testigo positivo, la frecuencia de manchas en el intervalo de 2 a 64 células fue mayor para 1, 5 y 10 mM, descendiendo en este mismo orden. La dispersión en el número de manchas por mosca mostró un comportamiento irregular, a 0.5 mM la mayoría de las moscas recobradas presentaron de 0-4 manchas; a 1 mM se encontró más dispersión y todas las moscas presentaron manchas (de 2 a 45 células), finalmente a 10 mM nuevamente se recobraron moscas que no mostraron manchas y otras tuvieron hasta 21 manchas en sus alas. La dispersión en esta distribución podría estar relacionada con la inducción de mecanismos de desintoxicación que favorecieran la eliminación del derivado reactivo (a 0.5, 5 y 10 mM?), los cuales finalmente modifican la distribución de manera similar, y la saturación gradual de estos mecanismos alternativos permitiría la producción de manchas mientras no se alcance la inducción del siguiente nivel de eliminación de genotóxicos (1mM). Cabe mencionar que al igual que en todos los tratamientos, la incorporación de la solución conteniendo al GES se hizo por diluciones consecutivas, por lo que no sería posible adjudicar los resultados obtenidos a un error en la preparación de los tratamientos.

Cuando las larvas de 72 h de edad se someten a un tratamiento agudo con la mezcla de GES + DMN (6 h) y posteriormente a una exposición crónica del aminoácido (48 h), se aumento de manera notable la frecuencia de todo tipo de manchas con respecto al testigo positivo (DMN) en las concentraciones 1 a 5 mM de GES; el incremento fue débil positivo para manchas grandes, gemelas y totales en la concentración de 0.5 mM ($P < 0.05$) (Tabla N, y Fig. 25a). Al igual que en las larvas de primer estado, la frecuencia de manchas chicas no se modificó. Para manchas grandes, la cantidad de estas fue mayor y dependiente de concentración, lo que sugiere que la actividad del compuesto derivado de la mezcla GES + DMN actúa al principio de la exposición y probablemente es

excretado después, o tiene vida media corta. El efecto se recobró tanto para manchas de tipo *mwh* como *flr*. En las series experimentales el número de divisiones celulares promedio fue mayor al de la DMN.

Al analizar la dispersión en la distribución del número de células que forman cada mancha se encontró la misma tendencia que con el agente alquilante (DMN), es decir, manchas de 1 a 32 células. Se observó una relación directa entre la concentración de la mezcla y la frecuencia de manchas de distinto tamaño conforme aumentó la concentración del aminoácido (Fig. 25b). Comparada con la DMN, la dispersión de la distribución del número de manchas por mosca fue mucho mayor a partir de 0.5 mM, en la que se recobraron moscas con 59 manchas, y aún más conforme se incrementó la concentración de GES (Fig. 25c).

Es importante señalar que el cotratamiento con GES ocasionó la muerte en estado de pupa de los organismos más sensibles, por lo que el número de moscas recobradas fue reducido, y por esta razón, los resultados deben tomarse como preliminares ya que sería recomendable verificar la repetibilidad de la respuesta.

Los resultados obtenidos con β -alanina y GES administrados antes o en combinación con el mutágeno mostraron potenciación de la genotoxicidad de la DMN de manera similar a los tratamientos con la taurina, por lo que no fue posible adjudicar a alguno de los extremos terminales la actividad observada con la taurina ya que el efecto de los antagonistas GES y β -alanina no mostró diferencias importantes que permitan atribuir la participación del grupo carboxil o amino en el efecto potenciador del daño genotóxico; más bien, los resultados indican la participación de ambos extremos en el efecto observado.

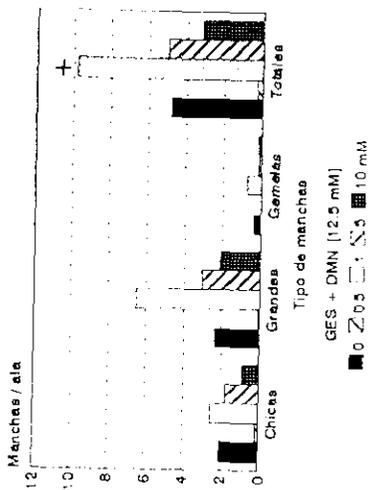
De manera adicional, se observó que los tres cotratamientos: taurina+DMN, β -alanina+DMN, GES+DMN interfirieron con el desarrollo de los organismos expuestos. En particular, se presentaron invaginaciones en las alas que formaban 4 capas de monocélulas en lugar de sólo dos: una dorsal y una ventral. Este efecto ha sido relacionado con la disfunción de genes reguladores del desarrollo del ala cuyo efecto implica la inducción de nuevos planos dorsal y ventral (Fig. 26a) (Lawrence, 1992). Una alteración muy frecuente fue la inducción de setas extras en la superficie del ala, es importante aclarar que las setas son estructuras sensoriales formadas por 7 células que se diferencian en células del tricógeno y del termógeno y que asumen funciones sensoriales y de nutrición; normalmente se localizan sobre las venas y en los bordes externos de las alas pero no sobre la superficie de las alas en las que sólo

Tabla XI. Manchas / ala inducidas con diferentes concentraciones de GES en larvas de 24 y 72 h de edad.

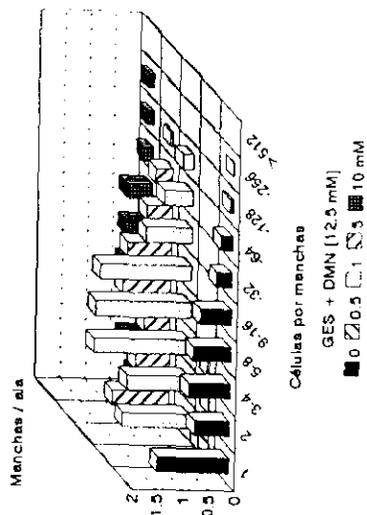
Compuesto [mM]	Número de alas analfazala	Simulium frontrale			Simulium m-2			Porcentaje de manchas	Promedio del número de alas de división celular	Frecue ncia de alones x10 ⁻³
		Simulium frontrale (S-2001) m=2	Simulium frontrale (S-2001) m=5	Simulium frontrale (S-2001) m=2	Simulium frontrale (S-2001) m=5	Simulium m-2	Simulium m-2			
DMN [12,5 mM]	142	2.05 (291)	2.35 (333)	0.39 (55)	4.78 (679)	3.80 (540)	0.59 (84)	2.90	17.2	
Exposición: 24 X 48 (GES) X 6 (DMN)										
0.5	40	0.22 (9) -	0.05 (2) -	0.0 (0)	0.28 (11) -	0.28 (11)	0.0	1.45	1.1	
1	40	2.53 (101) -	6.50 (260) w	0.73 (29) w	9.75 (390) +	7.37 (295)	1.65 (66)	3.74	33.2	
5	40	1.80 (72) -	3.03 (121) w	0.17 (7) -	5.00 (200) -	4.47 (179)	0.35 (14)	3.48	19.1	
10	40	0.87 (35) -	2.10 (84) -	0.22 (9) -	3.20 (128) -	2.50 (100)	0.47 (19)	4.11	11.2	
Exposición: 72 X 6 (GES + DMN) X 48 (GES)										
0.5	46	1.96 (90) -	4.87 (224) w	0.78 (36) w	7.61 (350) w	5.54 (255)	1.28 (59)	3.62	26.0	
5	46	3.91 (180) +	10.24 (471) +	1.41 (65) +	15.57 (716) +	10.39 (478)	3.76 (173)	3.43	48.4	

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

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca.

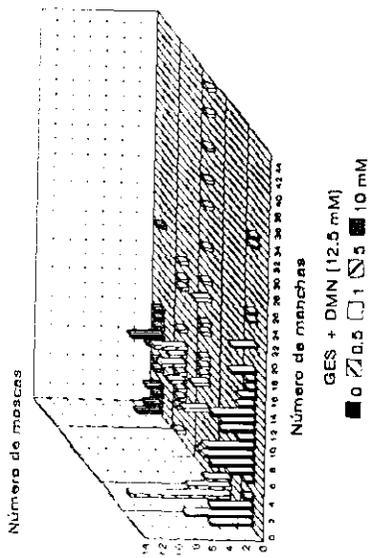
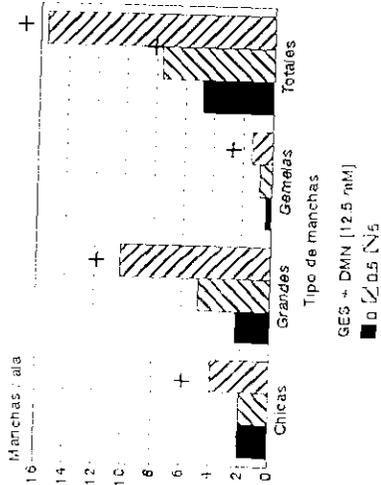
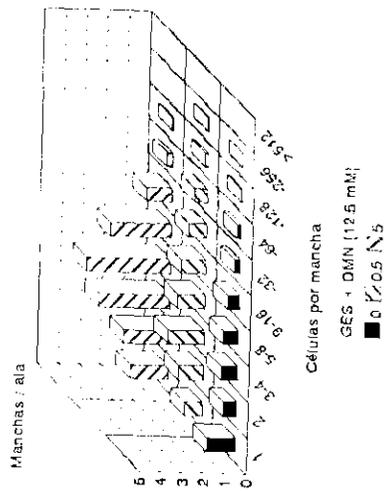


Fig. 24 Manchas por ala inducidas por GES + DMN en larvas (*mwh +/+ flr*) de 24 h de edad.

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca.

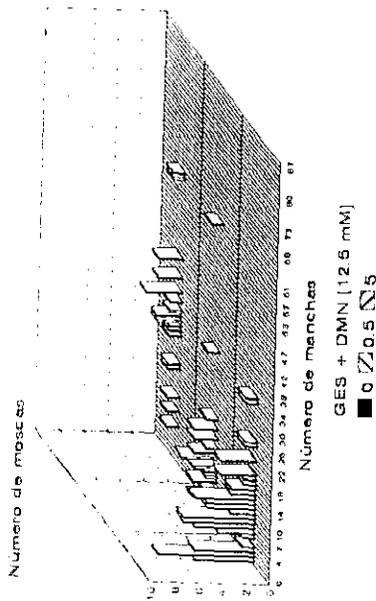
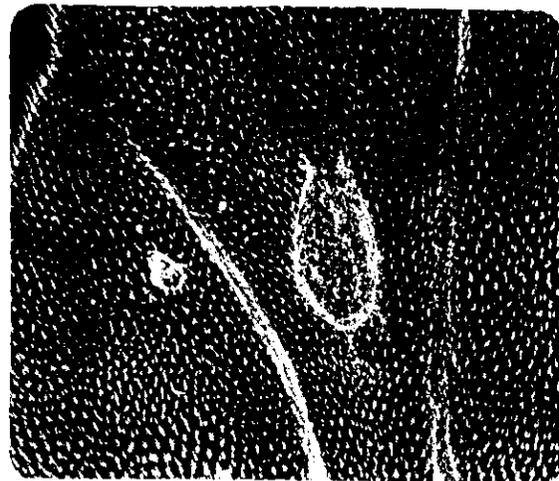
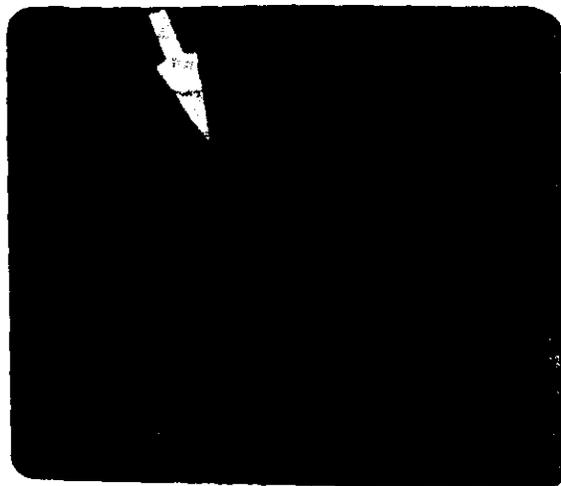


Fig. 25 Manchas por ala inducidas por GES+DMN en larvas (*mwh +/+ flr*) de 72 h de edad.

Fig. 26 Alteraciones inducidas en los cotratamientos con β - alanina y GES con la DMN en larvas de 72 h de edad.



a



b



c

deben formarse pelos o tricomas, los que como se ha indicado son procesos unicelulares. Otra alteración fue la presencia de venación adicional, acompañada por el depósito de un pigmento de color amarillo, generalmente en las zonas en las que se encontraba el pigmento la orientación de los tricomas estaba alterada y mostraba además, venas adicionales. En algunas regiones se alteró la polaridad proximal-distal de las alas. Normalmente, los tricomas, cerdas o setas y el plano de división de las células que forman las alas se orienta de manera proximal-distal, en algunos casos, la expresión de ciertos genes mutantes altera el reconocimiento de este plano de orientación provocando la aparición de arreglos concéntricos o en espiral, con cierta abundancia en las alas de los organismos expuestos a los cotratamientos, pero no en los tratamientos con los aminoácidos por separado (Fig. 26b). Se ha indicado que la polaridad de los tricomas está regulada por varios genes, lo que posiblemente indica que la interacción de estos aminoácidos con la DMN, de alguna manera interfiere en la expresión de las señales de genes que regulan la polaridad de los tricomas, alterando la localización del ensamblaje de los haces de F-actina (Adler, 1992). El tamaño pequeño de las áreas en las que los tricomas perdieron la polaridad, sugiere que esta alteración ocurrió principalmente en las últimas divisiones del disco imagal del ala.

Por otro lado, los cotratamientos con β -alanina + DMN y GES - DMN alteraron la fusión de los tergitos del abdomen de las moscas (Fig. 26c). También se observó que en general, el efecto de los cotratamientos fue mayor en las larvas de tercer estadio que en las de primer estadio. Esto permite proponer dos posibilidades: 1) las larvas de primer estadio fueron afectadas en proporción a su menor capacidad para biotransformar al o los derivados genotóxicos, en comparación con las larvas de tercer estadio y 2) la interacción se debe a la formación de un producto adicional que es reactivo debido a que los compuestos reaccionan directamente sin necesidad de la participación metabólica de los organismos expuestos, ya que en el protocolo probado en las larvas de tercer estadio los compuestos primero se mezclaron y después se administraron a las moscas.

Otro aspecto que se analizó en este trabajo fue el tipo de manchas recobrado: *mwh* o *flr*, ambos pueden formar parte de las denominadas manchas simples, sin embargo, se sabe que la frecuencia de aparición de las manchas *mwh* es mucho mayor que la de las manchas de tipo *flr*, las cuales son más bien raras. De los eventos que detecta la prueba SMART, la mutación puntual, pérdida, recombinación y no disyunción formarían una mancha de tipo *mwh*, sin embargo, no se ha descrito la mutación puntual de *flr* \rightarrow *flr*, la pérdida del

alelo *flr* podría ocurrir en una frecuencia muy baja ya que se trata de un gen intersticial localizado entre el centrómero y el marcador distal *mwh*, y por lo común, las pérdidas intersticiales son menos frecuentes que las distales, como sería el caso del marcador *mwh*; la no disyunción originaria clones de tipo *flr* con tanta frecuencia como clones *mwh* (Fig. 27), sin embargo, esto no explica la presencia de clones *flr* de gran tamaño porque las células aneuploides tienen baja capacidad proliferativa y se recobraron manchas de más de 30 células con la expresión *flr*. Se ha determinado que aneuploidógenos como la vincristina producen en la SMART manchas formadas por 1 a 2 células (Muñoz, 1997).

Se ha considerado que la SMART en sus dos versiones: con células de las alas y la de los ojos detecta diferentes eventos terminales, no obstante, se ha propuesto que es especialmente eficiente para indicar recombinación mitótica, lo que podría explicar en parte la presencia de las manchas de tipo *flr*. Para estimar en qué frecuencia cabría esperar la producción de este tipo de manchas se hizo el siguiente cálculo. Si la frecuencia de eventos de recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr* es cercana a 0.3, es decir, 300/1000 alas y la frecuencia de manchas gemelas es 0.03 o 30/1000 alas, entonces podría calcularse la probabilidad de aparición de manchas de tipo *flr* suponiendo que derivan de dos eventos de recombinación que involucran a las cuatro cromátidas (Fig. 28) en $(0.3 \times 0.03) = 0.009$ o 9/1000 alas. Debido a que el número de alas que se registra por tratamiento es mucho más bajo no se espera encontrar estas manchas en los lotes testigo. Sin embargo, tomando como referencia a la DMN que sí produce manchas de tipo *flr*, se estimó la frecuencia de manchas simples chicas y grandes derivadas de recombinación mediante la resta de las manchas recobradas en tratamientos con DMN en moscas libres de inversión y portadoras del cromosoma TM3, que tiene inversiones múltiples y por lo tanto impide recobrar eventos viables de recombinación. Así, con base en los datos presentados en las tablas VIII y XII, la frecuencia de manchas recobradas por recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr* = 3.68 y la de gemelas que se originan por recombinación entre el marcador *flr* y el centrómero = 0.37, por lo que cabría esperar $3.68 \times 0.37 = 1.36$ manchas de tipo *flr* producidas por eventos simultáneos de recombinación entre *mwh-flr* y *flr*-centrómero, la cual es mayor a la observada = 0.59 (Tabla VIII), esto explica al menos en parte la presencia de estas manchas por eventos simultáneos de recombinación.

Fig. 27 Eventos genéticos que inducen manchas flr

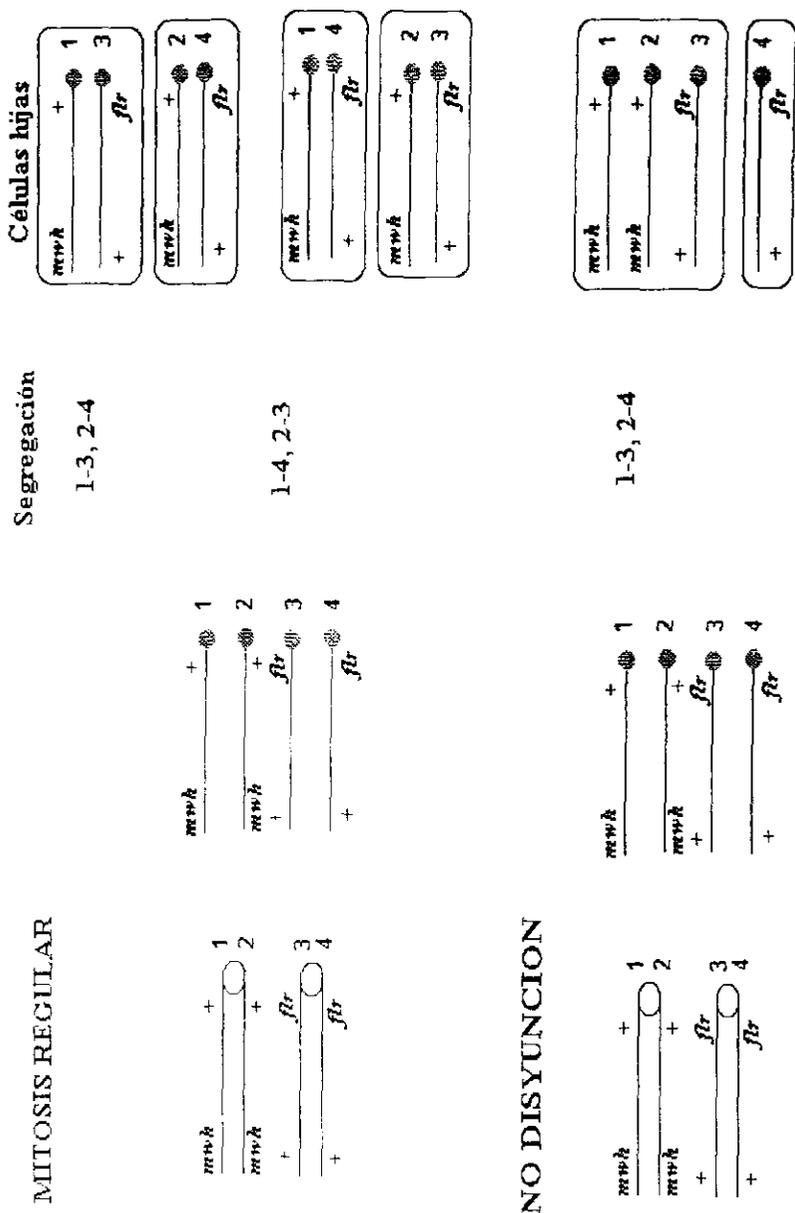


Fig. 27 Eventos genéticos que inducen manchas *flr* (continuación)

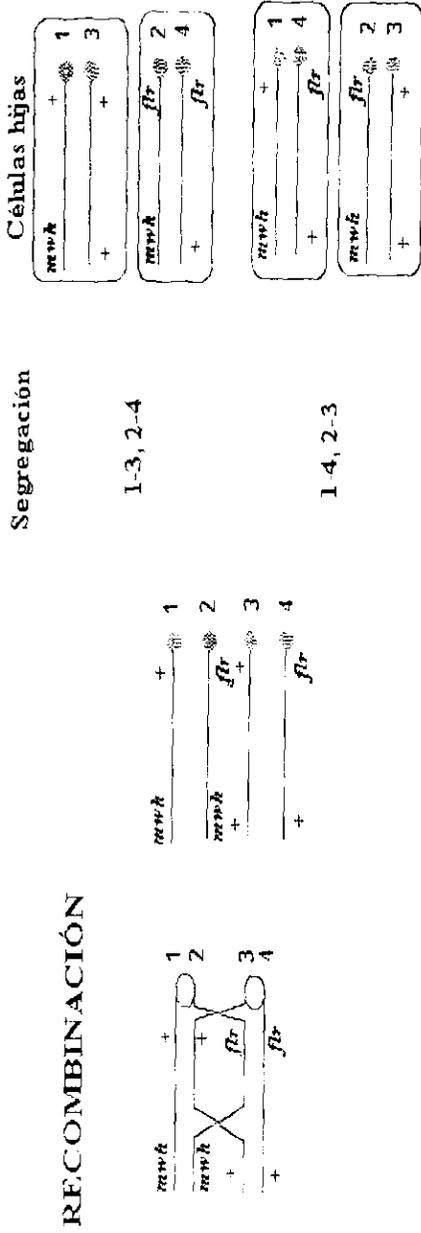
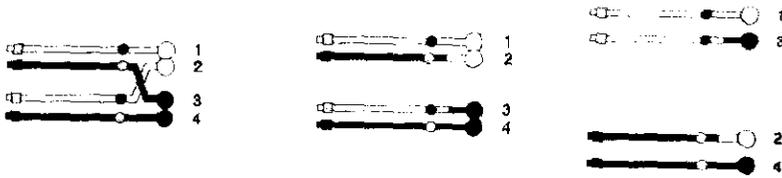


Fig. 28 Formación de manchas *flr* por dos eventos de recombinación.



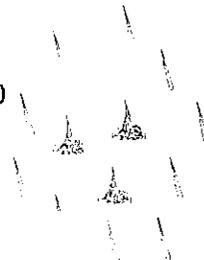
$P(\text{Recombinación } mwh-flr = 0.3 = 300/1000)$



$P(\text{Recombinación } flr\text{-centr6mero} = 0.03 = 30/1000)$



$P(\text{Recombinaci3n simult3nea } mwh-flr \text{ y } flr\text{-centr6mero} = (0.3)(0.03) = 0.009 = 9/1000)$



Participación de la recombinación mitótica

Para determinar la contribución de la recombinación mitótica se procedió a analizar la progenie portadora del cromosoma balanceador (que impide recobrar eventos de recombinación) del tratamiento a larvas de 72 h de edad expuestas a taurina sin la DMN (protocolo II). Los resultados revelaron que la taurina *per se* no indujo mutación somática ni recombinación mitótica en todas las concentraciones probadas (Tabla XII; Fig. 29a), fue notorio en este análisis que no se recobraron manchas grandes (excepto en el testigo negativo) y que en la concentración 5 mM se registró una mancha gemela (formada por células de tipo *mwh* y *flr*) la cual no cabría esperar ya que las moscas portadoras del cromosoma balanceador no tienen en su genotipo al marcador *flr*, sin embargo fue un evento único y no se registraron manchas de tipo *flr*. El número de ciclos de división fue similar al del testigo, excepto a 50 mM en que fue algo menor. La dispersión en la distribución de células que forman cada mancha fue menor a la del testigo negativo ya que se recobraron manchas de 1 a 2 células, y como se indicó anteriormente, sólo a 5 mM se recobró una mancha gemela de 13 células (Fig. 29b). Con respecto a la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca no se observaron diferencias entre las moscas expuestas a taurina y el testigo negativo (Fig. 29c).

En larvas tratadas con la mezcla (Taurina + DMN) por 6 h, y después con taurina 48 h, se observó nuevamente un incremento sobre las frecuencias obtenidas en los tratamientos con la DMN, siendo significativo para manchas chicas, grandes y totales en todas las concentraciones (excepto a 0.5 y 1 mM para manchas grandes). Tanto en el testigo positivo como en todas las series experimentales se recobraron además manchas gemelas, siendo la frecuencia significativa a 10 mM ($P < 0.05$) (Tabla XII; Fig. 30a). Al clasificar las manchas como *mwh* y *flr* se observó que en las series expuestas a la mezcla, se recobraron manchas de ambos tipos. Como ya se indicó, en estas moscas, no se espera el fenotipo *flr*. El número de ciclos de división promedio que produjeron a las manchas fue menor al de la DMN a 0.5 y 1 mM de taurina y similar para el resto de las concentraciones. La máxima inducción se obtuvo a 10 mM de taurina, a diferencia de lo recobrado con las moscas libres de inversión en las que ésta se observó a 0.5 mM de taurina, y en segundo lugar por 10 mM (Tabla VIII). Con respecto al análisis de la dispersión en la distribución del número de células por manchas, ésta fue mayor de 5 a 50 mM, con respecto a su testigo; se recobraron manchas de todos los tamaños en una frecuencia notable dependiente de la concentración de taurina en la mezcla (Fig. 30b). Al comparar la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca ésta fue

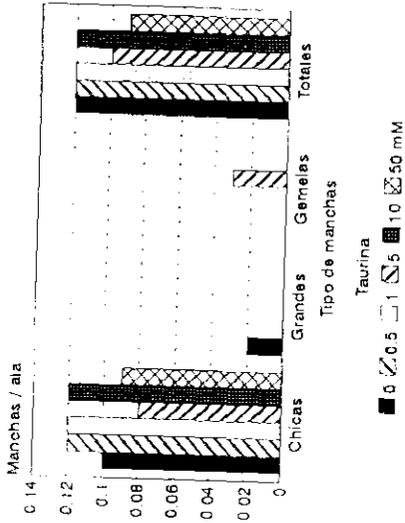
Tabla XII. Manchas / ala inducidas con diferentes concentraciones de Taurina en larvas de 72 h de edad portadoras de la inversión.

Exposición: 72 X 6 (Taurina + agua destilada o DMN) X 48 (Taurina)

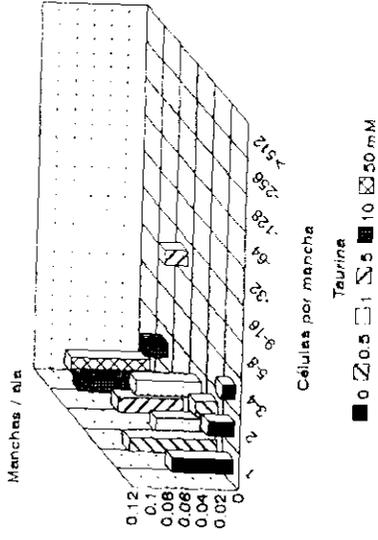
Concentración [µM]	Número de larvas analizadas	Manchas / ala	Manchas / ala (media)	Manchas / ala (desviación estándar)	Manchas / ala (n)	Manchas / ala (media)	Manchas / ala (desviación estándar)	Manchas / ala (n)	Promedio del número de manchas / ala de todas las divisiones de la muestra	Prueba de significación
Agua destilada	120	0.10 (12)	0.02 (2)	0.12 (14)	0.00 (0)	0.12 (14)	0.00 (0)	0.12 (14)	0.0	0.5
0.5	40	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5)	0.0	0.5
1	40	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5)	0.0	0.5
5	40	0.08 (3) -	0.00 (0)	0.10 (4) -	0.03 (1)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.08 (3)	0.0	0.4
10	40	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5) -	0.00 (0)	0.12 (5)	0.0	0.5
50	80	0.09 (7) -	0.00 (0)	0.09 (7) -	0.00 (0)	0.09 (7) -	0.00 (0)	0.09 (7)	0.0	0.4
DMN [12.5 ppm]	140	0.26 (37)	0.46 (65)	0.75 (105)	0.02 (3)	0.75 (105)	0.02 (3)	0.73 (102)	0.0	3.1
0.5	40	0.62 (25) +	0.22 (9) -	0.87 (35) -	0.03 (1) -	0.87 (35) -	0.03 (1) -	0.75 (30)	0.10 (4)	3.2
1	40	0.75 (30) +	0.62 (25) -	1.40 (56) +	0.03 (1) -	1.40 (56) +	0.03 (1) -	1.27 (51)	0.10 (4)	5.3
5	40	1.25 (50) +	2.40 (96) +	3.67 (147) +	0.03 (1) -	3.67 (147) +	0.03 (1) -	3.62 (145)	0.03 (1)	15.0
10	40	1.90 (76) +	3.58 (143) +	5.57 (223) +	0.10 (4) +	5.57 (223) +	0.10 (4) +	5.45 (218)	0.03 (1)	22.8
50	80	1.46 (117) +	1.95 (156) +	3.46 (227) +	0.05 (4) -	3.46 (227) +	0.05 (4) -	3.28 (262)	0.14 (11)	13.6

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

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Manchas / mosca.

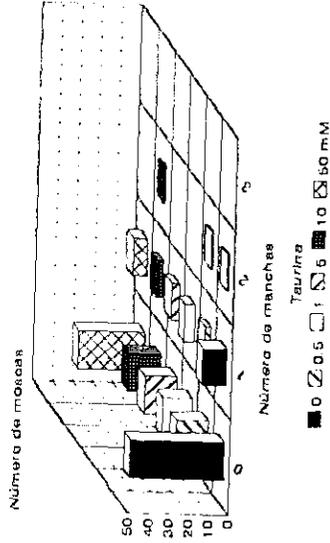
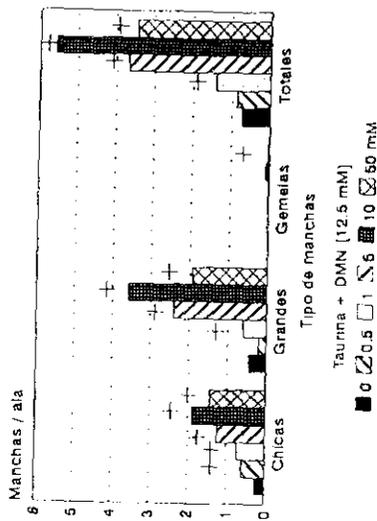
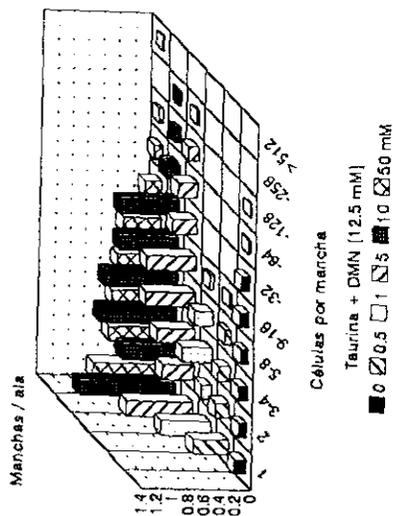


Fig. 29 Manchas por ala inducidas por taurina en larvas (*mwh* + / *TM3,Ser*) de 72 h de edad.

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca

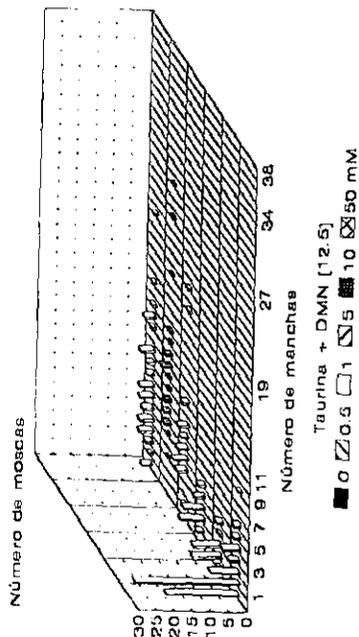


Fig. 30 Manchas por ala inducidas por taurina+DMN en larvas (mwh + / TM3, Ser) de 72 h de edad..

mayor a la del lote con la DMN a partir de 5 mM y similar a la de las moscas libres de inversión (Figs. 17c y 30c).

Como se indicó previamente, la aparición de manchas de tipo *flr* no puede explicarse a través del genotipo de estas moscas (Fig. 31), por lo que no debe descartarse la posibilidad de que la interacción química entre la taurina y la DMN sea responsable de la aparición del alelo *flr*.

Para determinar la contribución de los eventos de recombinación a las frecuencias totales detectadas en los cotratamientos de taurina + DMN, se utilizó una modificación del procedimiento propuesto por Frei *et al.* (1992) (Graf *et al.*, 1992), que consiste en comparar la frecuencia de clones *mwh* entre los dos tipos de moscas: libres de inversión y portadoras del cromosoma balanceador, ya que las últimas no expresan eventos recombinogénicos por lo que la diferencia en las frecuencias estima la proporción de eventos de naturaleza recombinogénica. Dados los resultados obtenidos en este estudio se decidió utilizar la frecuencia total de manchas para establecer la comparación entre ambos tipos de moscas. La figura 32 muestra de manera cualitativa que la recombinación contribuyó en más del 50 % a la producción de los eventos recobrados.

Finalmente se analizaron tres opciones más para explicar los resultados obtenidos. Una se enfocó a determinar si el efecto observado era producto de la interacción química entre los compuestos; otra a estimar la inducción de fenocopias que confundieran la variable de respuesta estudiada y finalmente, se analizó la inducción *de novo* del alelo *flr* por los compuestos probados.

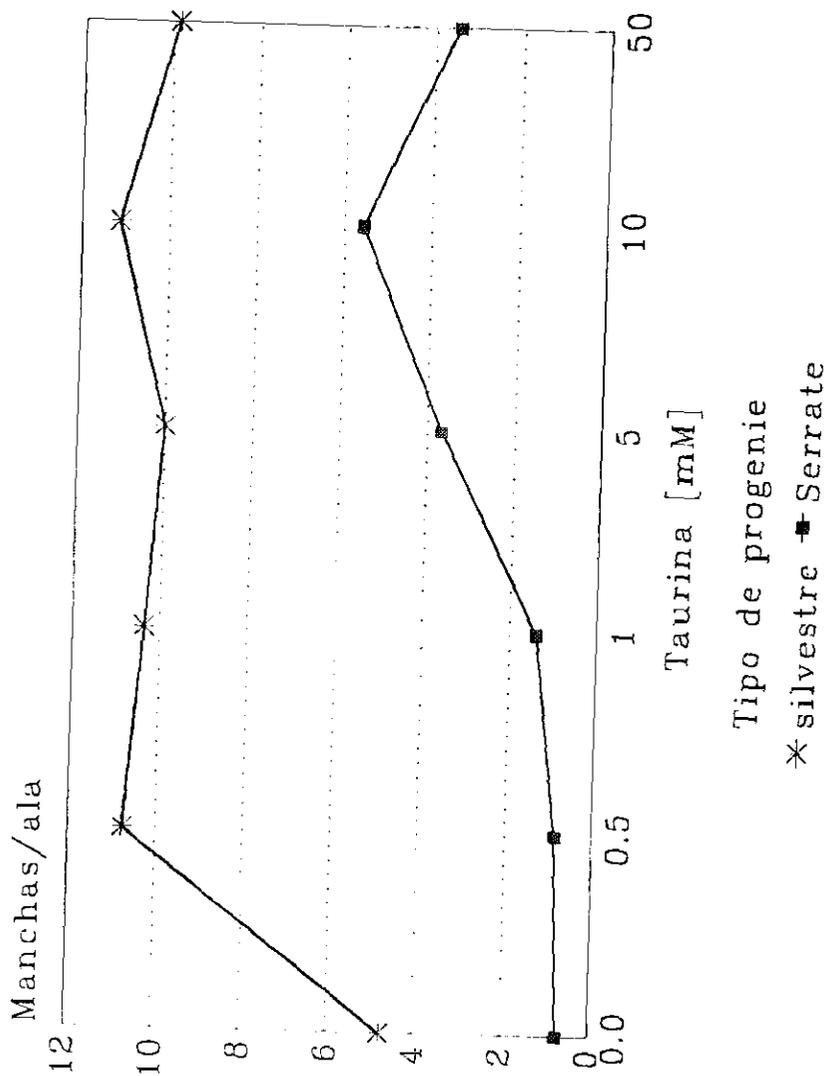
Interacción química entre la taurina y la DMN

Con la finalidad de determinar si el efecto potenciador está limitado al tratamiento agudo con la mezcla, se expusieron larvas de 72 h de edad únicamente a un tratamiento agudo con la mezcla de taurina [5 mM] + DMN durante 6 h y posteriormente las larvas se transfirieron a medio de cultivo hasta la emergencia de los adultos (ver esquema a continuación). Para el tratamiento se utilizaron dos cepas de moscas con los marcadores utilizados en el análisis pero que difieren en la presencia de un tercer marcador *ebony (e)*, el cual se introdujo para garantizar una correcta clasificación de los organismos portadores del cromosoma balanceador.

Fig. 31 Relación de los eventos genéticos y el tipo de manchas en la SMART.

Tipo de manchas	Libres de inversión	Portadoras del cromosoma balanceador (<i>Serrata</i>)
mwh	<ul style="list-style-type: none"> • mutación puntual • pérdidas • recombinación mitótica • no disyunción 	<ul style="list-style-type: none"> • mutación puntual • pérdidas • no disyunción
gemelas	<ul style="list-style-type: none"> • recombinación entre el marcador <i>flr</i> y el <i>centrómero</i> 	
flr	<ul style="list-style-type: none"> • no disyunción • mutación puntual • recombinación simultánea (<i>mult-flr</i>) y (<i>flr-centrómero</i>) • pérdidas 	

Fig.32 Manchas por ala inducidas por (taurina + DMN) y taurina en larvas libres de inversión y portadoras de TM3, Ser



Tipo de progenie

* silvestre ■ Serrate

Comprobación del fenotipo de las moscas portadoras de inversiones

Reportes recientes indican que en *Drosophila melanogaster* algunos aneuploidógenos y los teratógenos en general, pueden inducir la formación de una muesca en el borde de las alas, debido a la interferencia en la función normal del gen *Notched*. (Lynch *et al.*, 1991). El aspecto de las alas de estas moscas es similar al de las alas de moscas portadoras del gen *Serrate*, que en la SMART se utiliza para distinguir a las moscas libres de inversión ($\cdot flr \cdot \cdot mwh$) de las portadoras del cromosoma balanceador ($TM3, Ser \cdot mwh$). Esta información y las numerosas alteraciones encontradas en el tratamiento con la mezcla de taurina + DMN, planteó la posibilidad de que este tratamiento estuviera interfiriendo con la diferenciación del borde de las alas, por lo que debería descartarse que se cometiera un error en la clasificación fenotípica de las moscas al momento de fijarlas, lo que ayudaría a explicar la aparición de manchas gemelas y *flr* en las moscas clasificadas como portadoras del cromosoma balanceador (Tabla XII) y que podrían ser una mezcla de moscas libres de inversión con fenotipo alterado y moscas portadoras del cromosoma balanceador.

Para analizar la inducción de fenotipos similares a la expresión del gen *Serrate* se tomó como punto de partida la información genética del cromosoma balanceador (*TM3*) (Figs. 6 y 33) el cual contiene una serie de alelos mutantes, entre los cuales se encuentra el marcador recesivo para el color del cuerpo ebano (*e*) lo que permite diseñar una cruce alternativa en la que las hembras $flr^1/TM3, Ser$, cuyo genotipo detallado es $flr^1 TM3[In(3L,R)-TM3, y \cdot r p^{\cdot} sep bx^{34} e^S Ser]$, son portadoras del gen (e^S) (recientemente se ha reportado que es el alelo *e* y no e^S), por lo que al cruzarlas con machos $mwh e / mwh e$, se obtiene el mismo tipo de progenie que en la cruce estándar, pero difiere de la anterior porque el marcador *ebony* (*e*) en los machos, permite identificar fenotípicamente la progenie portadora del cromosoma balanceador, ya que la presencia del marcador *ebony* se expresa únicamente en las moscas portadoras del cromosoma balanceador, produciendo un color de cuerpo café oscuro (Fig. 34). Así, el uso de este marcador permite una clasificación precisa de las moscas portadoras del balanceador y las libres de inversión que deben tener el color de cuerpo característico del tipo silvestre gris-pardo

Con el objeto de descartar la inducción de fenocopias del gen *Serrate* se expusieron larvas de 72 h de edad a un tratamiento agudo con la mezcla de taurina 5 mM + DMN, posteriormente las larvas se transfirieron a medio de cultivo con taurina [5 mM] hasta la emergencia del adulto

Fig. 33 Características del cromosoma balanceador (TM3) (Tomado de Lidsley y Zimm, 1992).

Propiedades:

- ◆ Inversiones múltiples que abarcan casi la totalidad del cromosoma.
- ◆ Inhibe la recombinación del cromosoma 3.
- ◆ El marcador fenotípico es un gen letal dominante.

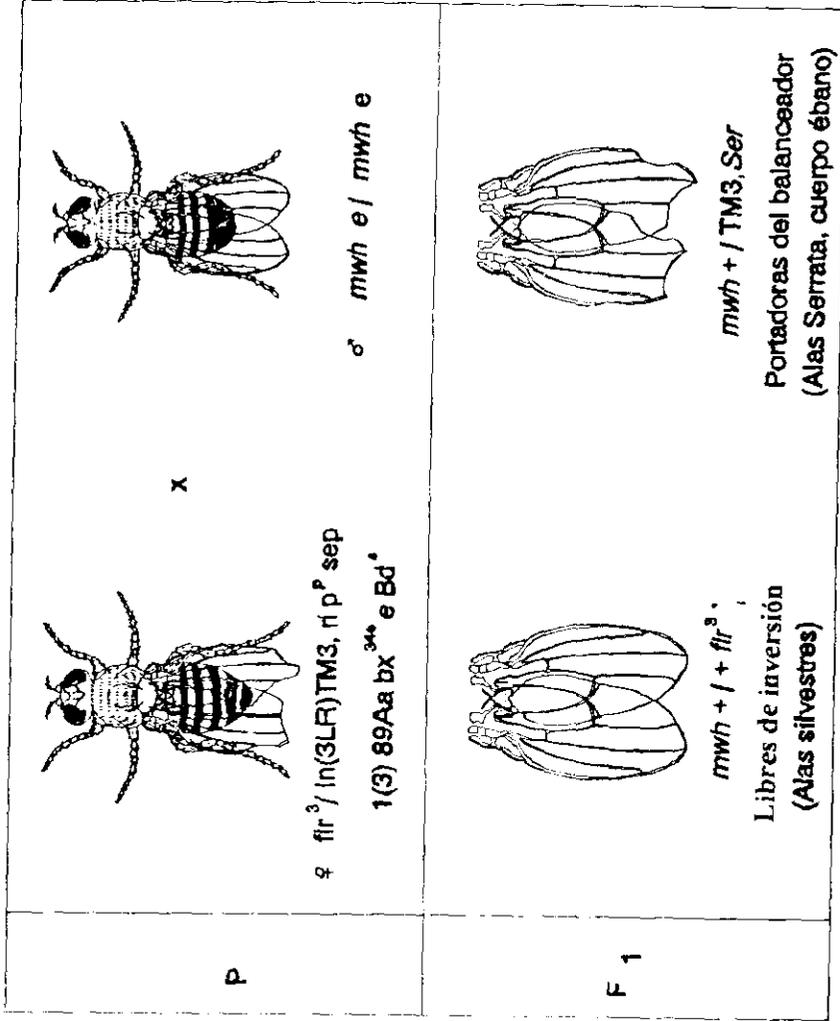


Fig. 34. Cruza progenitora diseñada en SMART para descartar fenocopias (Tomado de Maldonado, 1994).

Cruza:

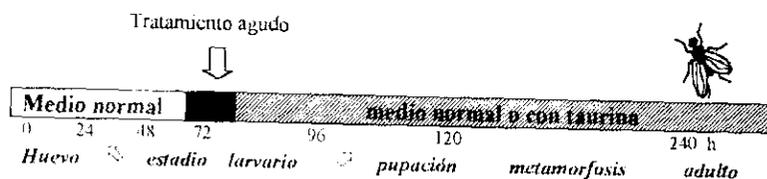
Estandar *flr3 TM3, Ser X mwh mwh*

Progenie analizada

Portadora del cromosoma balanceador y libre de inversión

Alternativa *flr3 TM3, Ser X mwh e mwh e*

Portadora del cromosoma balanceador



■ Taurina [5 mM] + DMN [12.5mM]

▨ Taurina [5 mM]

Los resultados del análisis morfológico para el color del cuerpo en la progenie recobrada, mostraron que la clasificación por fenotipo fue correcta ya que todas las moscas libres de inversión tuvieron cuerpo de color gris-pardo mientras que las portadoras del balanceador eran simultáneamente *Serrate* y *ehony*. Al comparar contra la DMN el efecto de la mezcla taurina + DMN, seguido por taurina y el de la mezcla únicamente, se encontró que en el último se recobró la mayor inducción de manchas y no se registraron manchas de tipo *flr*, pero al exponer a las larvas a la mezcla y a continuación a la taurina sí, lo anterior parece indicar que es la administración posterior de este aminoácido lo que induce la aparición del alelo *flr* (Tabla XIII y Fig. 35a). La dispersión en la distribución del número de células por mancha fue similar en los lotes con la DMN, la mezcla + taurina y la mezcla sola (Fig. 35b) y la frecuencia de producción de los diferentes tamaños de mancha se incrementaron el orden: mezcla > mezcla + taurina > DMN. La dispersión de la distribución del número de moscas por mancha fue similar, aunque con la mezcla se recobraron algunos organismos con 20 manchas en sus alas (Fig. 35c).

Finalmente y debido al resultado anterior en el que se obtuvo un incremento en la frecuencia de todos los tipos de manchas, incluyendo la aparición de las manchas de tipo *flr* lo que parece estar asociado con la administración de la taurina posterior a la exposición a la mezcla, se decidió administrar el mismo tratamiento a moscas no portadoras de marcadores con la intención de comprobar si efectivamente parte de las manchas son inducidas *de novo*.

Para corroborar la inducción de manchas, se utilizaron larvas de 72 h de edad, provenientes de la línea de tipo silvestre Canton-S (que no llevan los marcadores genéticos), las cuales se expusieron a los siguientes tratamientos:

- i) agua (testigo negativo)
- ii) taurina 5 mM, por 48 h
- iii) DMN 12.5 mM (testigo positivo), por 6 h
- iv) taurina 5 mM + DMN 12.5 mM, por 6 h, seguido por taurina 5 mM por 48 h.

Los resultados obtenidos (Tabla XIV y Fig. 36a)) revelaron que como se esperaba, en el testigo negativo no se recobraron manchas. Las moscas tratadas con taurina mostraron 3 manchas simples chicas, lo que apoya la idea de que la taurina tiene la capacidad de inducir alteraciones en las células somáticas. En el tratamiento con la DMN se recobraron manchas simples chicas y ahora también grandes (hasta de 8 células); esta nitrosamina es conocida por su potente actividad mutagénica, por lo que la aparición de estas manchas indica que efectivamente se comporta como describe la literatura (Graf *et al.*, 1984 Muñoz, 1997). En las moscas expuestas a la mezcla y después a taurina se reprodujo fielmente la respuesta observada anteriormente, es decir, efectivamente este tratamiento induce *de novo* manchas de todos los tipos, con una frecuencia notablemente alta (Fig. 36a). En cuanto al tipo de manchas, éstas fueron tanto de tipo *mwh* como de tipo *flr*. Al realizar el análisis de la dispersión en la distribución del número de células por mancha (Fig. 36b) se observó que tanto la DMN como la mezcla + taurina indujeron manchas de 1 a 16 células, y en el segundo tratamiento una mancha que tenía entre 64 y 127 células, este dato es importante porque descarta la posibilidad de que las manchas recobradas sean exclusivamente fenocopias ya que en estas no se observaría un efecto proliferativo, es decir, la actividad de estos tratamientos alteró realmente la información genética de las células de las alas y la alteración se propagó a las células que formaron parte del clon. Por último, la distribución del número de manchas por mosca del tratamiento potenciador fue también similar al obtenido anteriormente, es decir, algunos organismos resultan especialmente susceptibles al tratamiento, mientras que otros no son afectados.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la taurina es un aminoácido que de alguna manera debe interferir con la correcta determinación y diferenciación de las células de las alas de *Drosophila*. La interacción química entre compuestos del tipo de la taurina y el agente alquilante DMN potencia la actividad genotóxica de la nitrosamina y, la administración posterior de la taurina aumenta aún más este efecto por incorporar eventos *de novo*, tanto *mwh*

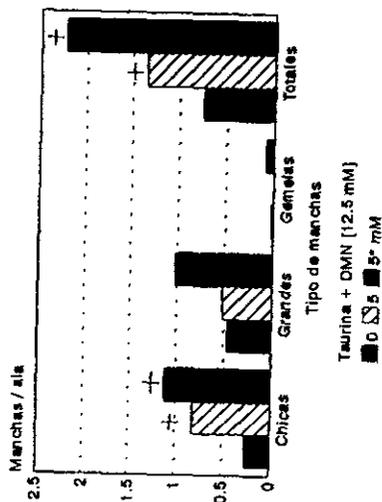
Tabla XIII. Manchas / ala inducidas con taurina [5 mM] + DMN en larvas ebano portadoras de la inversión (+ *mwh e/TMS, Ser e*) de 72 h de edad.

Concentración [mM]	Superficie inducida (mm ²)		Superficie inducida (mm ²)		Superficie inducida (mm ²)		P (valor de mancha)	P (valor de mancha)	P (valor de mancha)
	Superficie inducida (mm ²)								
DMN [12.5 ppm]	140	0.26 (37)	0.46 (65)	0.02 (3)	0.75 (105)	0.73 (102)	0.0	3.52	3.1
Taurina *	40	0.82 (33) +	0.52 (21) -	0.00	1.35 (54) +	1.35 (54)	0.0	2.37	5.5
Taurina *	40	1.12 (45) +	1.02 (41) w	0.08 (3) i	2.22 (89) +	2.05 (82)	0.10 (4)	2.84	8.7

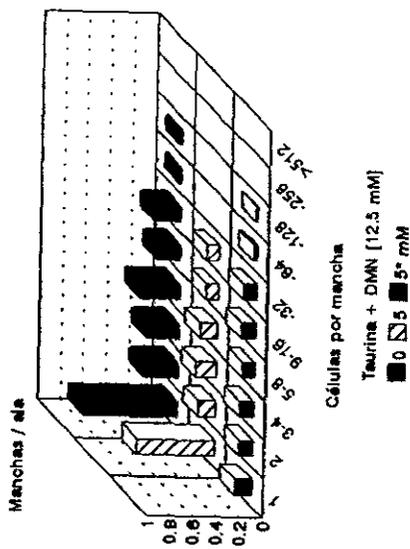
Exposición: * 72 X 6 (Taurina + DMN); ** Exposición: 72 X 6 (Taurina + DMN) X 48 (Taurina)

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

a) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca

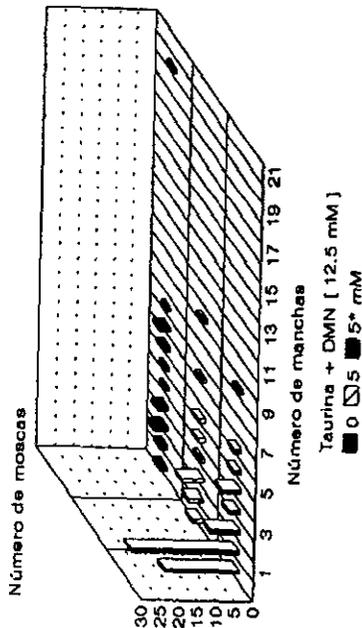
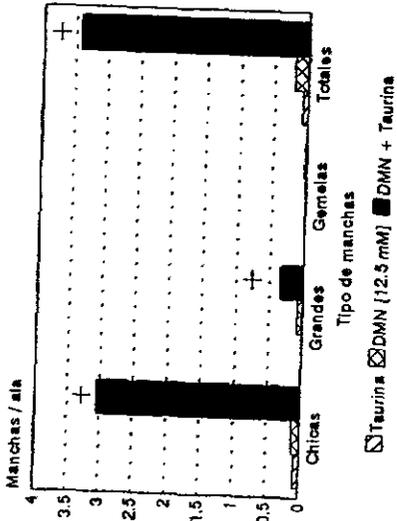
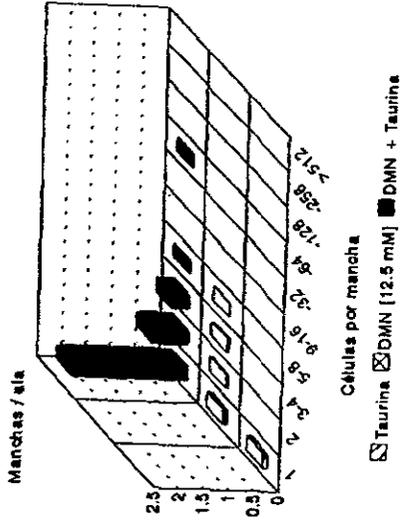


Fig. 35 Manchas por ala inducidas por taurina + DMN en larvas (*mwh* e / *TM3, e Ser*) de 72 h de edad.

e) Tipo de manchas por ala.



b) Células / mancha



c) Número de manchas por mosca

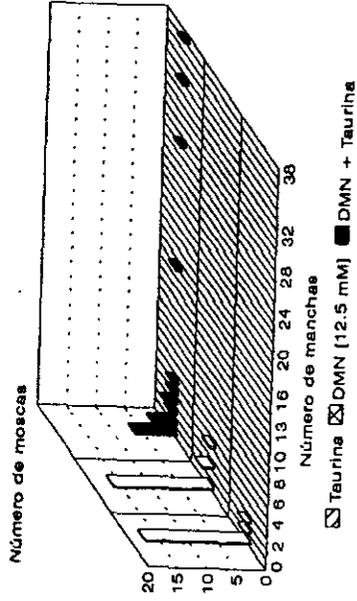


Fig. 36 Manchas por ala inducidas por taurina + DMN en larvas silvestres (C-S) de 72 h de edad.

como *flr*. Se ha documentado en numerosos grupos de trabajo que utilizan la prueba SMART, que los eventos de mutación del alelo silvestre para *mwh* hacia la forma mutante y viceversa $mwh^+ \leftrightarrow mwh$ ocurren de manera espontánea y con relativa frecuencia, por lo que se recomienda tener particular cuidado en el mantenimiento de las líneas de moscas mutantes, de manera que se garantice la frecuencia del alelo en las moscas que se utilizan para experimentación. Aunque no se ha descrito si los eventos de mutación y retromutación se asocian con alteraciones como en corrimiento del marco de lectura, por eventos de pérdida y recombinación, por modificación química de las bases como alquilación, o algún otro; debe implicar un mecanismo que sea fácilmente reproducible ya que la frecuencia de ocurrencia es alta. Por otra parte, el alelo *flr* fue inducido de manera experimental al tratar moscas con el compuesto etil-metano sulfonato ($CH_3SO_2OCH_2CH_3$) García-Bellido y Dapena, 1974; Lindsley y Zimm, 1992), un mutágeno reconocido por su actividad alquilante y que también comparte con los otros compuestos utilizados en este trabajo semejanzas en su estructura química. Por lo anterior, resultaría relativamente probable que ocurriera la inducción *de novo* del alelo de tipo *flr* tanto en las moscas estándar portadoras de marcadores para la SMART como en moscas de tipo silvestre. Este aspecto es importante porque no dependería del diseño genético del sistema SMART, sino más bien del tipo de actividad de estos compuestos y de sus interacciones. Es importante continuar en este sentido para determinar de manera específica la interacción que ocurre entre los compuestos utilizados y cómo se relaciona con la susceptibilidad de los organismos expuestos, es decir, la gran dispersión que se recobra en la respuesta depende de la capacidad metabólica de los organismos tratados?, de su capacidad de reparación del daño genético?, o bien de la suma de estos factores e inclusive aún de otros.

CONCLUSIONES

- La taurina y la β - alanina no parecen ser genotóxicos en células somáticas de *Drosophila*, sin embargo la interacción de estos compuestos con el agente alquilante monofuncional N-nitroso-dimetilamina (DMN) ha mostrado que potencia el daño e interfiere en la expresión génica durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.
- Es necesario continuar los estudios con ambos análogos de la taurina (β -alanina y GES) utilizando otros mutágenos de referencia para llegar a establecer el mecanismo que interfiere en la expresión génica.
- La interacción de los compuestos con la DMN induce la aparición de manchas de tipo *flr* y *mwh*.
- El efecto potenciador de la mezcla parece producirse por la combinación química entre los compuestos y la DMN.
- La β - alanina y el GES ocasionan alteraciones en el desarrollo y la diferenciación de las alas, probablemente debido a que estos aminoácidos son antagonistas de la taurina.

REFERENCIAS

- **Abundis, H. M.** (1996) Determinación de la mutación y recombinación somáticas en la inducción de efectos genotóxicos por tres sales de vanadio en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 90.
- **Agrawal, H. C., A. H. Davinson y C. K. Kaaz Marack.** (1971) Subcellular distribution of taurine and cysteine sulphinate decarboxylase in developing rat brain. *Biochem. J.* 122: 759-761.
- **Ahtee, L., D. J. Boullin y M. K. Paasonen.** (1974) transport of taurine by human blood platelets. *Br. J. Pharmacol.* 52: 245-251.
- **Alder, P. N.** (1992) The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *BioEssays.* 14: 735-741.
- **Ament, M. A., H. S. Gegfee, J. R. Heckenlively, D. A. Martín y J. Kopple.** (1986) Taurine supplementation in infants receiving long term total parenteral nutrition. *J. Am. Coll Nutr.* 5: 127-135
- **Ames B., W. Durston, E. Yamasaki y F. Lee.** (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test systems combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 2281-2285.
- **Ames, B. N.** (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science.* 221: 1256-1262
- **Ames, B. N.** (1989) Mutagenesis and carcinogenesis: Endogenous and exogenous factors. *Environ. Mutagen.* 13: 1-12.
- **Anderson, D. T.** (1972) En Counce, S. J. y Waddington, C. H. (eds), Academic Press. Nueva York. Developmental Systems: *Insects.* Vol 1. 165-242 p.

- **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. *Mutation Res.* 72: 257-264
- **Baskin, S. L. y R. Dagimanjian.** (1973) Possible involvement of taurine in the genesis of muscular dystrophy. *Nature:* 121: 245-464.
- **Bernardi, N.** (1985) On the role of taurine in the cerebellar cortex: a reappraisal. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamer.* 35: 153-164.
- **Berson, E. L., K. C Hayes, A. R. Rabin y S. Y. Schmidt.** (1976) Retinal degeneration in cats fed casein: II. Supplementation with methionine, cysteine or taurine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 15: 52-58.
- **Brusick, D.** (1988). Evolution of testing strategies for genetic toxicity. *Mutation Res.* 205: 69-78.
- **Cairns, J.** (1981) The origin of human cancers. *Nature.* 289: 353-357
- **Cañas, E. P y A. Valenzuela.** (1991) Rol biológico y nutricional de la taurina y sus derivados en la fisiología orgánica y celular. *Arch. Lat. Nut.* *XLI.* 139-151.
- **Carr, B. J.** (1985) Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet. *Cancer* 55: 218-224.
- **Chandley, A. C y A. J. Bateman.** (1962) Timing of spermatogenesis in *Drosophila* using tritiated thymidine. *Nature.* 20: 229-300.
- **Chipponi, J. X., J. C. Bleier, M. T. Santi y D. Rudman.** (1982) Deficiencies of essential and conditionally essential nutrients. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 1112-1116.
- **Clayson, D.** (1980). Comparison between *in vitro* and *in vivo* tests for carcinogenicity. *Mutation Res.* 75: 205-213.

- **Cortinas de Nava, C. Y A. J. Espinosa.** (1990) Cáncer y ambiente. Bases Epidemiológicas para su investigación y su control. Carcinogénesis. *Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud Ambiental. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.* México. D.F. 75 pp.
- **Cozzi, R., R. Ricardy, F. Bartolini, L. Ramadori, P. Perticone y R. De Salvia.** (1995) Taurine and ellagic acid: Two differently – acting natural antioxidants. *Environ. Mol. Mutag.* 26: 248-254.
- **Crabai, F. A. y G. Pepeon.** (1979) Taurine concentration in the neurohypophysis of different animal species. *J. Neurochem.* 23: 1091-1092.
- **Crick F. C. H. y P. A. Lawrence** (1975) Compartments and polyclones in insect development. *Science.* 189: 340-347
- **Davison, A. N y L. K. Kaczmarek.** (1971) Taurine- a possible neurotransmitter? *Nature.* 234: 107.
- **De Serres, F. J.** (1979). Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. *Am. 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, U.N.A.M. 75 pp.
- **Demerec, M.** (1965) *Biology of Drosophila.* Hafner Publishing Company. Nueva York, 633 pp.
- **EMS (Environmental Mutagen Society).** (1976) Environmental mutagen hazards. *Science.* 187: 503-514.
- **Emudianughe. T. S., J. Caldwell y R. L. Smith.** (1983) The utilization of exogenous taurine for the conjugation of xenobiotic acids in the ferret. *Xenobiotica.* 13: 133-138.

- **Flores, L. R.** (1991) Las leguminosas como fuentes alternativas de taurina en la dieta. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 46 pp.
- **Florkin, M. y E. Schoffeniels.** (1965) Euryalinity and the concept of physiology radiation. En: *Studies in comparative biochemistry*. Munda K.A. (Ed). Pergamon Press. Inglaterra, 6-40 pp.
- **Frei, H y F.E. Würgler** (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Res.* 203: 297-308.
- **Frei, H., J. Clements, D. Howe. y F. E. Würgler.** (1992) The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation. Res.* 279: 21-33.
- **Gabrielian, K., H. M. Wang, T. E. Ogden, y S. J. Ryan.** (1992) *In vitro* stimulation of retinal pigment epithelium proliferation by taurine. *Curr Eye Res.* 11: 481-487.
- **Gall, G.E., D. K. Rassin, M. C. R. Raiha y K. Heinonen.** (1977) Milk protein quantity and quality in low weight infants. III. Effects on sulfur containing amino acids in plasma and urine. *J.Pediatric.* 90: 348-355.
- **García-Bellido, A. y J. Dapena.** (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 128: 117-130.
- **García-Bellido A. y J. R. Merriam.** (1971a) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 24: 61-87.
- **García-Bellido, A. y J. R. Merriam.** (1971b) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 26: 264-276.
- **Gaull. G. E., C. E. Wright y H. H. Tallan.** (1983) Taurine in human

lymphoblastoid cells: uptake and role in proliferation. En: *Sulfur Amino Acids: Biochemical and Clinical Aspects*. Ed. Kuriyama K; Huxtable. R.J y Iwata. H. A.R. Liss. Nueva York. pp. 297-303.

- **Gilbert, S. F.** (1990) *Developmental Biology*. 2ed. Sinaver Associates, Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts.
- **Gilles, R.** (1979) Intracellular organic osmotic effectors. En: *Mechanisms of osmoregulation in animals*. Gilles, R. (Ed). John Willey. Chichester, pp. 111-154.
- **Giri, S. N. y Q. Wang.** (1992) Taurine and niacin offer a novel therapeutic modality in prevention of chemically-induced pulmonary fibrosis in hamster. En: *Albertini et al (Eds): Taurine*. Nueva York. Plenum. Press.
- **Golic, K. G.** (1991) Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science*. 252: 958-961.
- **Gordon, R.E., A. A. Shacked y Solano, D.F.** (1986) Taurine protects hamster bronchioles from acute NO₂- induced alterations- a histologic, ultrastructural and freeze fracture study. *Am. J. Pathol.* 125: 585-600.
- **Graf U., F. E. Würgler, A. J. Katz, H. J. Frei, H. Juon, C. Hall y P. Kale.** (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.
- **Graf, U., H. Juon, A. J. Katz, H.J. Frei, F.E. Würgler.** (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutation Res.* 120: 233-239.
- **Graf, U., M. Badoux y E. Hollinger.** (1992) The carcinogen DAB is highly genotoxic in the improved highly bioactivation cross of the *Drosophila* wing spot test (SMART), *DIS.* 71: 235-236.
- **Greenwald, G., K. C. Burch-Whitman y B. S. Kramer.** (1995) Chemoprevention. *Cancer J. C.* 45:31-49.

- **Halliwell, B y I. A. Okezie.** (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. 281: 9-19.
- **Harman, D.** (1981) The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 7124-7128.
- **Hartman, P. E y D. M. Shankel.** (1990) Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative inteceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* 15: 145-182.
- **Hayes, K. C y T. A. Sturman.** (1981) Taurine in metabolism. *A. Rev. Nutr.* 1: 401-425.
- **Hayes, K. C.** (1985) Taurine deficiency in a child on total parenteral nutrition. *Nutr. Rev.* 43:81-83.
- **Hayes, K. C., R. E. Carey y S. Y. Schmidt.** (1975 a) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in cats. *Science.* 188: 949-951.
- **Hayes, K. C., A. R. Rabin. y E. L. Berson.** (1975b) An ultrastructural study of nutritionally induced reversed retinal degeneration in cast. *Am. J. Pathol.* 78: 504-524.
- **Huxtable, R. J.** (1986) Biochemistry of sulfur. Plenum, Nueva York. 121p.
- **Huxtable, R.J.** (1989) Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog. Neurobiol.* 32. 471.
- **Huxtable, R. J.** (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72: 101-163
- **Huxtable, R. J y R. Bressler.** (1974) Elevation of taurine in human congestive heart failure. *Life Sci.* 14: 1353-1359.

- **IARC.** (1987) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity, Vols. 1-42, International Agency for Research on cancer, Lyon, WHO. Francia. pp. 100-106.
- **Imaki, H., R. C. Moretz, H. M. Wisniewski y J.A. Sturman.** (1986) Feline maternal taurine deficiency: Effects on retina and tapetum of offspring. *Dev. Neurosci.* 8: 160-181.
- **Index Merck** (1989) Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals. Publish by Merck and Co., Inc. Rahway. N. U.S.A. 11 ed. 1606 p.
- **IPCS** (1985) Guide to short -term test for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. *Environ. Health Criteria* 51. WHO, Geneva, pp. 14-15.
- **Jabcobsen, J. G. y L. H. Smith.** (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivates. *Physiol. Rev.* 48: 424-511.
- **Jacobsen, J. G., L. L. Thomas y L. H. Smith.** (1964) Properties and distribution of mammalian L-cystein sulfinate descarboxilases. *Biochim. Biophys. Acta* 85: 103-108
- **Jowett, T.** (1991) Transgenic *Drosophila* as an *in vivo* model for studying mammalian drug metabolism. *BioEssays.* 13: 683-687.
- **Kataoka, H. y M. Ghuishi.** (1986) Ocurrence of taurine in plants. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1887-1888.
- **Katz, A.J.** (1989) Sodium thiosulfate inhibits cisplatin- induced mutagenesis in somatic tissue of *Drosophila*. *Environ. Molec. Mutag.* 13: 97-99.
- **Kilbey, B. J., D. J. MacDonald, C. Auerbach, F. H. Sobels y E. W. Vogel.** (1981). The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutation Res.* 85: 141-146.

- **Kulakowski, E. C. y J. Maturo.** (1984) Hypoglycemic properties of taurine: not mediated by enhanced insulin release. *Biochem. Pharmacol.* 33: 2835-2838.
- **Laidlaw, S. A., M. F. Dietrich, M. P. Lamtenzan, H. I. Vargas, J. B. Block y J. D. Kopple.** (1989) Antimutagenic effects of taurine in a bacterial assay system. *Cancer. Res.* 49: 6600-6604.
- **Lake, N. y L. DeMarte.** (1988) Effects of β -alanina treatment on the taurine and DNA content of the rat heart and retina. *Neurochem. Res.* 13: 1003-1006.
- **Laval, J., S. Boiteux y T. R. O'Connor.** (1990) Physiological properties and repair of apurinic/ apyrimidinic sites and imidazole ring-opened guanine in DNA. *Mutat. Res.* 233: 73-79.
- **Lawrence, P. A.** (1992) *The making of a fly: the genetics of animal design.* Blackwell Scientific publications. The Alden Press, Oxford. p. 228.
- **Lindsley, D. L y G. Zimm.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic, Press, Inc. U.S.A., 1133 pp.
- **Lipton, J. M. y C. G. Ticker.** (1979) Central effect of taurine and its analogues on fever caused by intravenous leukocytic pyrogen in the rabbit. *J. Physiol.* 287: 535-543.
- **Madhavan, M. M. y H. A. Schneiderman.** (1977) Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 183: 269-305.
- **Maldonado, L. J.** (1994) Comparación entre la estructura química y la actividad mutagenica de cinco compuestos organicos en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 60 pp

- **Mandel, P. y H. Pasantes-Morales.** (1978) Taurine in the nervous system. En: *Reviews of Neuroscience*. Vol. 3. S. Ehrenpreis E. I. Kopin (Eds) Raven. Pres, Nueva York. 157-194 pp.
- **Margison. G. P. y P. J. O'Connor** (1979) Nucleic acid modification by N-Nitroso compounds. En: *Chemical carcinogens and DNA* P.L. Grover (Ed) CRC Press, Boca Ratón, Florida. Vol. I, 111-160.
- **Marnela, K. M., P. Kontro y S. S. Oja.** (1984) Effects of prolonged guanidinoethane sulfonate administration on taurine and other amino acids in rat tissues. *Med. Biol.* 62: 239-244.
- **Masao, N.** (1990) Homeostatic and protective of taurine. En: *Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology and Cardiology*. Pasantes-Morales. H. Martín, D.L, Shain, W. Y Martín del Río, R. (Eds). Wiley-Liss, Inc. E.U. pp. 447-449.
- **Masuda, M., K. Horisaka y T. Koeda.** (1986) Effects of taurine on neutrophil function in hyperlipidemic rats. *Japan J. Pharm.* 40: 478-480.
- **Montenegro, J.** (1987) Contenido de taurina en alimentos de origen vegetal y animal. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, *U.N.A.M.* 70 p.
- **Moran, J. y H. Pasantes-Morales.** (1991) Taurine-deficient cultured cerebellar astrocytes and granule neurons obtained by treatment with guanidinoethane sulfonate. *J. Neurosci. Res.* 29: 533-537.
- **Muñoz, H. A.** (1997) Comparación del potencial aneuploidógeno de compuestos citostáticos en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, *UNAM*. 70 p.
- **Muñoz, M. J. A.** (1994) Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, *UNAM*. 65 p.

- **Muñoz, M. J. A.** (1998) Comparación de la genotoxicidad de la resina obtenida de la raíz de tres especies del género *Ipomea*: *I. orizabensis*, *I. jalapa* e *I. purga*. Mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas de *D. Melanogaster*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias. UNAM. 151 pp.
- **Nakashima, T., T. Takino. y K. Kuriyama.** (1983) Therapeutic and prophylactic effects of taurine administration on experimental liver injury. En: Sulphur Amino Acids: Biochemical and Clinical Aspects (Eds). Kuriyama K. Huxtable RJ y Iwata H pp. 449-459. Alan R.Liss Nueva York.
- **Negishi, T., T. Shiotani, K. Fujikawa. y H. Hayatsu.** (1991) The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster in vivo*: The correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test. *Mutation. Res.* 252:119-128.
- **Neuringer, M. y J. A. Sturman.** (1987) Visual acuity loss in Rhesus monkey infants fed a taurine- free human infant formula. *J. Neurosci. Res.* 18: 597-601.
- **Neuringer, M., J. A. Sturman, G. Y. Wen. y H. M. Wisniewski.** (1985) Dietary taurine is necessary for normal retinal development in monkeys. En: *Taurine: Biological Actions and Clinical Perspectives*. Oja, S., L. Ahtee, P. Kontro. y M. K. Paasonen. (Eds). Alan R. Liss Inc. E.U. A. pp. 53-62.
- **Nöthinger, R.** (1970) Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae. *DIS.* 45: 177.
- **Obe, G. y A. T. Natarajan.** (1982) Mechanisms of the origin of structural chromosomal aberrations, En: D. Muller, A. T. Natarajan, G. Obe y G. Rohrborn (Eds). Sister chromatid exchange test. Thieme Stratton Inc. Nueva York, pp. 1-5.
- **Parke, D. V.** (1986) Molecular aspects of toxicology: En Worden, A.N.,

D. V. Parke. y J. Marks. (Eds). The future of predictive safety evaluations. Vol.I 3-37

- **Pasantes-Morales H.** (1983) Taurina .En: Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. Herminia Pasantes-Morales y H. Aréchiga (Eds). UNAM, Méx, D.F. pp. 83-91.
- **Pasantes-Morales.** (1994) Alcances y aplicaciones de la taurina. *UNAM• hoy.* Año 2. Núm. 10: 31-36
- **Pasantes-Morales H., C. E. Wright. y G. E. Gaull.** (1984) Protective effects of taurine, zinc and tocopherol on retinol- induced damage in human lymphoblastoid cells. *J. Nutr.* 114: 2256-2261.
- **Pasantes-Morales H., C. E. Wright. y G. E. Gaull.** (1985) Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem. Pharmacol.* 34: 2205-2207
- **Pasantes-Morales. H., Klethi. J, Ledig. M y Mandel, P.** (1972) Free amino acids of chicken and rat retina. *Brain Res.* 41: 494-497.
- **Pasantes-Morales. H. O. Quesada, A. Carabez. y R. J. Huxtable.** (1983) Effects of the taurine transport antagonist, guanidinoethane sulfonate and β - alanina on the morphology of the rat retina. *J. Neurosci. Res.* 9: 135-143.
- **Pasantes- Morales, H., O. Quesada, L. Alcocer. y R. Sánchez.** (1989) Taurine content in foods. *Nut. Rep. Internat.* 40: 793-801.
- **Patel, A., J. M. Rochelle, J. M. Jones, J. Sumegi, G. R. Uhl, M. F. Seldin, M. H. Meisler. y P. Gregor.** (1994) Mapping of the taurine transporter gene to mouse chromosome 6 and to the short arm of human chromosome 3. *Genomics.* 25, 314-317.
- **Pearson, M. J.** (1974) The abdominal epidermis of *Calliphora erythrocephala* (Diptera) y Polyteny and growth in the larval cells. *J. Cell. Sci.* 16: 113-131.

- **Peto, R., R. Doll, J.D. Buckley y M. B. Sporn** (1981) Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* (London) 290: 201-208.
- **Phipps, M. E., F. Latiff, A. Prowse, S. J. Payne, J. Dietz-Band, M. Leversha, N. A. Affara, A. T. Moore, J. Tolmie, A. Schinzel, M. I. Lerman, M. A. Ferguson-Smith. y E. R. Maher.** (1994) Molecular genetic analysis of the 3p- syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 3: 903-908.
- **Pioin, P. D., M. D. Kittleson, Q. R. Rogers. y J. G. Morris.** (1987) Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: A reversible cardiomyopathy. *Science.* 237: 764-766.
- **Pomerai, D. D.** (1990) From gene to animal: An introduction to the molecular development. Cambridge University Press. 2 ed. Nueva York, 417 pp.
- **Radman, M. y A. Kinsella.** (1980) Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: Implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. En: R. Montesano, H. Bartsch y L. Tomatis (Eds.): *Molecular and Cellular Aspects for Carcinogen Screening Tests.* International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 75-90.
- **Ramos, P., H. Abundis, J. C. Gaytán, M. G. Ordaz, P. G. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E. M. Galicia y J. A. Muñoz.** (1993) Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster.* McGraw-Hill, México. 131 p.
- **Read, W. O y J. D. Welty.** (1963) Effects of taurine on epinephrine and digoxin-induced irregularities on dog heart. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 139: 283-289.
- **Roseland, C. R y H. A. Schneiderman.** (1979) Regulation and metamorphosis of the abdominal histoblast of *Drosophila melanogaster.* *Roux's Arch. Dev. Biol.* 186: 235-265.

- **Salamanca, F.** (1990) *Citogenética Humana. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas.* Editorial Médica Panamericana. México. D.F. 400 pp
- **Sbabaro, V.** (1974) Electroclinical effects of taurine in some epileptic patients. Preliminary results. *Acta Neurol.* 29: 33-37.
- **Schmidt, S. Y., E. L. Berson, G. Watson, y C. Huang.** (1977) Retinal degeneration in cats fed casein: III taurine deficiency and ERG amplitudes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16: 673-678.
- **Sebring, L. A y R. J. Huxtable.** (1985) Taurine modulation of calcium binding to cardiac sarcolemma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 445-451.
- **Shelby, M. D.** (1988) The genetic toxicity of human carcinogens and its implications (MTR 01275). *Mutation Res.* 204: 3-15.
- **Solís, L., A. Herranz, U. Herreras, J. Lerma, R. y Martín del Río.** (1988) Does taurine act as osmoregulatory substance in the rat brain?. *Neurosci. Lett.* 91: 53-58.
- **Spaeth, D. G. y D. L. Schneider.** (1974) Taurine synthesis, concentration and bili-salt conjugation in rat, guinea pig and rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147: 855-858.
- **Sturman, J. A.** (1973) Taurine pool size in rat: effect of vitamin B-6 deficiency and taurine diet. *J. Nutr.* 103: 1566-1580.
- **Sturman, J. A., J. Y. Wen, H. M. Wisniewski, y M. D. Neuringer.** (1984) Retinal degeneration in primates raised on a synthetic human infant formula. *Int. J. Devel. Neurosci.* 2: 121-126.
- **Szabad, J., Y. Soós, G. Polgár y G. Héjja** (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutation Res.* 113: 117-133.

- **Thomas, E. C., M. B. Grisham y M. M. Jefferson.** (1983) Myeloperoxidase dependent effect of animals on functions of isolated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 72:441-445.
- **Thurston, J. H., R. E. Hauhart. y J. A. Dirgo.** (1980) Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci.* 26: 1561-1568.
- **Thurston, J. H., R. E. Hauhart. y E. F. Naccarato.** (1981) Taurine: possible role in osmotic regulation of mammalian heart. *Science* 214: 1373-1374.
- **Tiedman, F. y L. Gmelin.** (1827) Einige neue bestandtheile der galle des ochtsen. *Ann. Physik. Chem.* 9: 326-337.
- **Tood N., J. Clements, P. Zoeller. y M. Phillips.** (1983). Absence of a mutagenic effect after feeding 4 anti-cancer drugs to *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 120: 121-125.
- **Valencia, R., S. Abrahamson, W. Von Halle, R. Woodeuff, F. E. Würgler y S Zimmering.** (1984) Chromosome mutations test (SCLT) for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.* 134: 61-88.
- **Vellan, E. J., L. R. Gjessing. y H. Stalsberg.** (1970) Free amino acids in the pineal and pituitary glands of human brain. *J. Neurochem.* 17: 699-701.
- **Vinton, N., S. A. Laidlaw, M. Ament. y J. D. Kopple.** (1986) Taurine concentrations in plasma and blood cells of patients undergoing long-term parental nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 398-404.
- **Vislie, T.** (1983) Cell volume regulation in fish heart ventricles with special reference to taurine. *Comp. Biochem. Physiol.* 764: 507-514.

- **Vogel, E. W.** (1988) Summary report on the performance of the *Drosophila melanogaster* assays, En: Evaluation of short-term tests for carcinogens. Ashby, J., F. J. de Serres, M. D. Shelby, B. H. Margolin, M. Ishidate y G. C. Becking (Eds) Report of the International Program on Chemical Safety's Collaborative Study on *in vivo* Assays II, WHO, Cambridge. p. 277-285.
- **Vogel, E.** (1992) Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).
- **Vogel, E. y A. Natarajan.** (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 62: 51-100.
- **Vogel, E. y A. Natarajan.** (1979b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 62: 101-123.
- **Vogel, E., W. Blijleven, P. Klapwijk y J. Zijlstra.** (1980) Some current perspectives of the application of *Drosophila* in the evaluation of carcinogens. En: G. M. Williams, R. Kroes, H. Waaijers y K. Van de Poll (Eds.) The Predictive Value of Short-term Screening Tests in Carcinogenicity. Elsevier, Amsterdam, pp. 125-147
- **Vogel, E., H. Frei, K. Fujikawa, U. Graf, S. Kondo, H. Ryo. Y F. E. Würgler.** (1985) Summary 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.
- **Wade, J. V., J. P. Olson, F. E. Samson, S. R. Nelson, y T. L. Paldernik,** (1988) A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem.* 51: 740-745.

- **Walz, W.** (1987) Evolution of the osmoregulatory function of taurine in brain cells. *Exp. Brain Res.* 68: 290-301.
- **Wang, Q., S. M. Giri, D. M. Hyde, y J. M. Nakashima.** (1989) Effects of taurine on bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 190: 330-338.
- **Waterfield, C. J., M. Mesquita, P. Parnham y J. A. Timbrell.** (1993) Taurine protects against the cytotoxicity of hydrazine, 1-4-naphthoquinone and carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 46: 589-595.
- **Weistein, C. L. y O. W. Griffith.** (1987) Multiple forms of rat liver cysteinesulfinate decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 262: 7254-7263.
- **Welty, J. D. y W. O. Read.** (1964) Studies of some cardiac effects of taurine. *J. Pharmacol. Exp. Theor.* 144: 110-115.
- **Whitte, J. R.** (1990) Pattern formation in imaginal discs. *Seminars in Cell Bioll.* 1: 241-252.
- **Wilkins, A. S.** (1986) Genetic analysis of animal development. John Wiley and Sons (Eds). Nueva York, 1500 pp.
- **Wright, A.** (1980) The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mutation Res.* 75: 215-241
- **Wright, C. E., H. H. Tallan, Y. Y. Linn. y G. E. Gaul.** (1986) Taurine: biological update. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 427-453.
- **Würgler, F., H. Juon y H. Frei.** (1983a) Promutagens detected by a rapid test with *Drosophila* somatic cells (Resúmen). *Experientia.* 39: 686
- **Würgler, F., U. Graf, H. Frei y H. Juon.** (1983b) Genotoxic activity of the anti-cancer drug methotrexate in somatic cells of *Drosophila*

melanogaster. *Mutation Res.* 122: 321-328

- **Würgler, F. E., U. Graf y 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 short-term tests for carcinogens, *Progress in Mutation. Res* 5, Elsevier/North. Holland, Amsterdam: 325-340.
- **Zijlstra, J. y E. W Vogel.** (1988 a) Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 198: 73-83.
- **Zijlstra, J. A. y E. W. Vogel.** (1988 b) Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazines, hidrazines and seniciphylline in *Drosophila melanogaster*. *Mutation. Res.* 202: 251-267.
- **Zimmering, S.** (1976) Utility of *Drosophila melanogaster* for detection of potencial environmental chemical mutagens. *Ann. N. Y. Acad. Scie.* 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? (Resumen) *Mutation. Res.* 252: 194-195.