



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

La taurina modifica la toxicidad y genotoxicidad inducida por la NDMA(N-nitrosodimetilamina) en *Drosophila melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

CARMEN ASUNCIÓN CASTRO RESENDIZ

DIRECTORA DE TESIS:

DOCTORA PATRICIA RAMOS MORALES
2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Castro
Resendiz
Carmen Asunción

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099073813

2. Datos del tutor

Dra.
Ramos
Morales
Patricia

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Jiménez
García
Luis Felipe

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Camacho
Carranza
Rafael

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Miranda
Anaya
Manuel

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Hernández
Muñoz
Adriana

7. Datos del trabajo escrito

La taurina modifica la toxicidad y genotoxicidad inducida por la NDMA (N-nitrosodimetilamina) en *Drosophila melanogaster*.
2010

A DIOS.

A mis padres Enrique y Carmen, por su amor y apoyo incondicional;
A mis hermanos Patricia y Enrique, por acompañarme en todo momento;
A mi amado esposo Adonay, por compartir su vida conmigo;
A mis hijas Almira y Laila, por la satisfacción que me inspiran día a día.

Agradezco a:

Dra. Patricia Ramos Morales, por el apoyo, la confianza y los conocimientos sin los cuales no hubiera concluido este trabajo.

Dr. Luis Felipe Jiménez García, por su entereza académica y personal.

Dr. Manuel Miranda Anaya, por escucharme, ayudarme y confiar en mí.

Dr. Rafael Camacho Carranza, por sus valiosos comentarios y correcciones al trabajo.

M. en C. Adriana Muñoz Hernández, por el interés en enriquecer el presente trabajo.

Biólogo Hugo Rivas por su ayuda y compañía en los días de trabajo en el laboratorio.

Físico Andrés Porta maestro y amigo, quien me ha brindado palabras de aliento durante mi formación académica y personal.

Lic. Martha Enriquez Ascencio, por permitirme conocer las bondades del quehacer científico.

M. en C. Carmen Patricia Rodríguez Pérez, por adoptarme y transmitirme el amor por la ciencia y la investigación.

La familia Castro y Resendiz, quienes me han acompañado y apoyado en todos los momentos difíciles y han creído en mí.

Sr. Humberto Cruz Reyes y Sra. Beatriz Reyes Molina, por su contribución a la finalización de este trabajo

Profesor Arturo Cidel Lopez †, quien me enseñó a ser una rinoceronte.

Mis amigos Martha, Thania, Edith, Ma. del Carmen, Rozibeth, Elena, Carolina, Julia, Yanelli, Ariana, Eduardo, Jolalpa, Andrés, Edgar, Ángel, Juan, Carlos, Jorge, Luis Antonio, Raúl, por escucharme, acompañarme y ayudarme a lo largo de cada etapa académica.

A todas y cada una de las personas que compartieron conmigo su estancia en el laboratorio de Genética y Toxicología, por todos los días de trabajo, por las conversaciones y el compañerismo demostrado a lo largo de estos años.

La Universidad Nacional Autónoma de México, por formarme académicamente.

ÍNDICE

| | Página |
|--------------------------------|--------|
| I.INTRODUCCIÓN | 1 |
| N-Nitrosodimetilamina (NDMA) | 4 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | 5 |
| Taurina | 7 |
| | |
| II. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| | |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 15 |
| | |
| IV.RESULTADOS | 25 |
| | |
| V.DISCUSIÓN | 43 |
| | |
| VI.CONCLUSIONES | 46 |
| | |
| VII.BIBLIOGRAFÍA | 47 |

RESUMEN

La taurina interfiere en numerosas funciones biológicas y fisiológicas. Actualmente su efectividad en diversas patologías se está probando clínicamente; además se considera inocua y no se ha reportado algún efecto negativo asociado al consumo de taurina. En este trabajo se evaluó el efecto de la taurina sobre la toxicidad y genotoxicidad inducida por la N-nitrosodimetilamina (NDMA) en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba de mutación somática y recombinación mitótica en las alas (SMART). Se utilizaron dos tipos de larvas: de tipo silvestre y portadoras de marcadores para evaluar la inducción de mutación somática y recombinación mitótica en ala. La taurina fue administrada a las larvas de 72 ± 4 h de edad mediante contacto-alimentación, las concentraciones utilizadas fueron 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 y 50.0 mM, las cuales fueron preparadas mediante disoluciones sucesivas, a partir de 50mM. Se utilizaron dos protocolos: en el primero se exploró si la taurina mostraba actividad genotóxica por lo que las larvas fueron pre-tratadas durante 6h con sacarosa 5% y posteriormente se trataron con diluciones sucesivas de taurina hasta completar su desarrollo; en el segundo se determinó si la taurina tenía efecto sobre la genotoxicidad inducida por la NDMA, en este caso las larvas se pre-trataron durante 6h con NDMA 5mM y después se trataron con soluciones sucesivas de taurina hasta completar su desarrollo. Se comparó la frecuencia de manchas obtenidas en las diferentes disoluciones de taurina para cada protocolo mediante el programa de cómputo SMART. Se compararon los Índices de sobrevivencia (IS), Índices Sexuales (ISex) para las moscas silvestres y moscas portadoras de marcadores recobradas de la cruce SMART; además se evaluó la actividad reproductiva de los machos silvestres tratados recobrados de ambos protocolos. Se concluye que la taurina en concentraciones altas muestra genotoxicidad. Por otro lado no mostro reducir la genotoxicidad de la NDMA en *Drosophila melanogaster*. Aunque los indicadores de genotoxicidad no muestran diferencias significativas entre las moscas expuestas a taurina y las moscas testigo se asume que la taurina no es inocua. Se sugiere la implementación del mismo protocolo a concentraciones inferiores a 5.0 mM para discernir mejor la toxicidad, genotoxicidad y reprotoxicidad de la taurina.

I. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos estamos expuestos constante e inevitablemente a sustancias, tanto naturales de origen vegetal o animal (toxinas, bacterias, venenos de animales) como las fabricadas por el hombre (fármacos, compuestos químicos industriales, plaguicidas) y las derivadas de actividad humana (productos de pirólisis de la cocción de alimentos y derivados domésticos).

El estudio de los efectos nocivos de las sustancias en los organismos es el objetivo de la toxicología (Eaton y Klaassen, 2005). Un tóxico se puede definir como cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta nociva en un biosistema (Hayes, 2001).

De acuerdo a Klaassen y Watkins (2005) el que tenga lugar o no la respuesta tóxica dependerá de las características químicas y físicas del compuesto, del lugar y la duración de la exposición, de la metabolización del agente por parte del sistema y de la sensibilidad del propio biosistema o individuo.

Las principales vías de exposición a sustancias tóxicas son oral, inhalatoria, dérmica y otras vías parenterales (intramuscular, intraperitoneal, intravenoso) (Gregus y Klaassen, 2005).

La toxicología genética estudia los efectos que ejercen los agentes químicos y físicos en la integridad, expresión y regulación del material genético de los organismos (Preston y Hoffmann, 2005). En la evaluación de las sustancias se busca reconocer aquellas con actividad genotóxica, con el fin de identificar el riesgo de exposición a éstas, así como caracterizar la relación dosis-respuesta y los mecanismos implicados en el efecto.

Los compuestos químicos que no son constituyentes propios del organismo son denominados xenobióticos y pueden clasificarse básicamente en dos tipos dependiendo

de la forma en la que funcionan: 1) de manera directa (genotóxicos), si son reactivos por sí mismos, es decir no requieren ser activados mediante el metabolismo del organismo expuesto y 2) de manera indirecta (pro-genotóxicos), requieren ser activados por las enzimas presentes en los organismos a derivados reactivos electrofílicos (Vogel, 1992). La biotransformación es la conversión metabólica de las sustancias químicas endógenas y xenobióticas en compuestos más hidrosolubles. En la biotransformación de los xenobióticos participan enzimas que tienen amplia especificidad por el sustrato.

Las reacciones de fase I: hidrólisis, reducción y oxidación, exponen o introducen un grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH₂ o COOH) a la sustancia y habitualmente aumentan la hidrofilia. Las reacciones de fase II: glucuronidación, sulfatación, acetilación, metilación y conjugación con glutatión pueden aumentar la hidrofilia y la eliminación (Parkinson, 2005). Las enzimas que biotransforman los xenobióticos se distribuyen ampliamente por los tejidos del cuerpo y están presentes en diversos compartimentos subcelulares. En los vertebrados, el hígado es la fuente más abundante de enzimas que catalizan las reacciones de biotransformación. Los microsomas hepáticos contienen numerosas enzimas que dependen del sistema de citocromos P-450 (CYP-450); estas enzimas tienen la capacidad de catalizar diversas reacciones (Klaassen y Watkins, 2005). Los sistemas microsomales de la mono-oxigenasa que contienen numerosas enzimas dependientes de CYP-450 tienen un papel importante en el metabolismo de sustratos endógenos así como en la desintoxicación de muchas drogas y de xenobióticos y en la activación de agentes ambientales a formas biológicamente inactivas.

Un concepto importante que surge de la relación entre la dosis y la respuesta cuando las dosis son bajas, es el de valor umbral o bien, dosis por debajo de la cual la probabilidad de que una célula o un individuo resulte afectado por efecto del

tratamiento es baja. En el caso de la relación entre dosis y respuesta se ha mostrado que existen umbrales para la mayoría de los efectos tóxicos; aunque la variabilidad interindividual de la respuesta que provoca la dosis hace difícil establecer una verdadera dosis carente de efectos (Klaassen y Watkins, 2005).

La pendiente de la relación de dosis-respuesta con dosis altas puede ser considerablemente distinta de la obtenida con dosis bajas. La saturación de las vías de biotransformación, de los puntos de unión de las proteínas o de los receptores y la disminución de los cofactores intracelulares son algunos de los mecanismos que influyen en la aparición de inflexiones bruscas en la relación entre la dosis y la respuesta (Klaassen y Watkins, 2005).

Debido a que los efectos de los mutágenos pueden variar entre especies e individuos, así como en diferentes tipos y estados celulares en los mismos organismos, la evaluación del daño que un agente genotóxico puede causar en el material genético debe estar basada en estrategias que involucren el uso de diferentes organismos, siguiendo una serie de etapas y cubriendo un amplio espectro de tipos de daño genético (Brusick, 1987).

El uso de metodologías experimentales para estudiar genotoxicidad contribuye a la identificación de compuestos con actividad potencialmente peligrosa para los seres vivos; sus efectos se estudian en células germinales y somáticas, así como *in vivo* e *in vitro*. En la genotoxicidad de un compuesto participan factores como: metabolismo, edad, sexo y constitución genética de los organismos, aspectos relacionados con la naturaleza química de los compuestos, el tipo de interacción que se establezca entre el compuesto o sus metabolitos con el ADN o la maquinaria celular y la capacidad del organismo para reparar el daño inducido, entre otros.

Un grupo de compuestos pro-genotóxicos considerados de gran interés y en consecuencia ampliamente estudiados, lo constituyen las nitrosaminas. Éstas se encuentran frecuentemente en nuestra dieta y medio ambiente, y pueden ser también sintetizadas endógenamente (Scanlan, 1983). Las moléculas de este grupo químico pueden tener actividad carcinogénica al ser activadas metabólicamente (Hong y Yang, 1985).

Una de las nitrosaminas más estudiada, la N-Nitrosodimetilamina (Sinónimos: Dimetilnitrosamina, N-metil-N-nitrosometamina; (NDMA) (Index Merck 1989) [CAS 62-75-9]; 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 de 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 (Index Merck, 1989).

Es un agente alquilante y carcinógeno potente (EMS, 1976), por lo que se usa como control positivo en estudios de mutagénesis (Williams, 1989). En células germinales de *Drosophila melanogaster* induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo y pérdida de cromosomas sexuales y, en menor grado no-disyunción, siendo mayor el efecto cuando se administra por alimentación (Vogel y Natarajan, 1979). En células somáticas de las alas y de los ojos de *Drosophila melanogaster*, induce mutación y

recombinación cuando se trata (contacto-alimentación) a larvas de diferentes edades y concentraciones que van desde 0.5 a 50 mM (Delgado, 1990; Muñoz, 1998).

Drosophila melanogaster

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ha sido empleada como organismo para el estudio de la genética, desde el nacimiento de esta disciplina en 1856 con los estudios de Mendel. A lo largo de casi 90 años de intensa investigación se ha logrado obtener una gran cantidad de información sobre diversos procesos biológicos fundamentales, tanto en el ámbito celular como en el del desarrollo, que son comunes a muchos eucariontes (Botas, 2007).

Drosophila melanogaster reúne las características de un organismo modelo, debido a su número cromosómico pequeño ($n=4$), bajo costo de mantenimiento en espacios reducidos, producción de prole numerosa, corta duración en su ciclo de vida (10 días a 25°C) (el cual permite distinguir entre el efecto de dosis crónicas, agudas y fraccionadas), además de ser sumamente sensible a bajas concentraciones y de conocerse detalladamente su genoma (Adams *et al.*, 2000).

Drosophila cuenta con enzimas de desintoxicación similares a las contenidas en la fracción S9 del hígado de mamíferos. Estas enzimas P-450 participan de manera importante en la reducción-activación de promutágenos y en el metabolismo de xenobióticos, en particular en el de moléculas que contienen átomos de nitrógeno, como en el caso de aminas metiladas, aminas, nitrosaminas, hidracinas, y aminas aromáticas (Zijlstra, 1988).

Las larvas tienen dos linajes celulares: larvario e imagal, el primero está implicado exclusivamente con el desarrollo y funcionamiento de la larva, mientras que el imagal está formado por paquetes de células contenidas en estructuras similares a

sacos y denominadas discos imagales; a partir de las células de los discos imagales se diferencian las estructuras particulares del cuerpo del adulto, por ejemplo: antenas, ojos, halterios, patas, genitales externos y alas (Russell, 1998). Desde el punto de vista genético, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada disco, aparece como primordio desde el primer estado larvario, en el que consiste de 20 a 50 células. A partir de ese momento, el número de células por cada disco se amplifica por mitosis hasta el final de la fase larvaria. Al final del tercer estadio, 4 días después de la eclosión, la larva inicia el periodo de pupación en el que ocurre histólisis de la mayor parte de su tejido (los tubos de Malpighi permanecen); las células forman tejidos y las estructuras del adulto de los discos imagales; durante este estado la cutícula se obscurece y 5 días después, emerge la mosca adulta. Una vez que el adulto despliega sus alas (4-6 h después), puede ingerir alimento y tener actividad reproductiva (Ramos *et al.*, 1993).

En *Drosophila melanogaster* existen metodologías que se basan en el desarrollo de las células somáticas para evaluar efectos genotóxicos.

En la versión para ala se utilizan marcadores recesivos de la superficie de las alas de las moscas adultas en condición heterocigota. La inducción de la pérdida de heterocigosis de los marcadores en las células de los discos imagales de las larvas mediante tratamientos con compuestos genotóxicos, conduce a la formación de un clon de células mutantes; que después de la metamorfosis forman un grupo de células con fenotipo mutante (denominado mancha) en el contexto silvestre de las alas. La principal ventaja de este sistema de prueba somática reside en el hecho de que detecta varios tipos de eventos que inducen mutación, además de la recombinación mitótica; es posible determinar la contribución de la recombinación mitótica en la respuesta total obtenida. También se tiene gran versatilidad de elección de protocolos en cuanto a la edad de las

larvas y al tipo de administración, lo que permite suministrar diferentes tratamientos con base en las características de los compuestos a probar (Graf *et al.*, 1984). El tiempo de ensayo es de una generación (10 días) y el material biológico se puede almacenar para posibles verificaciones de resultados. En un tamaño de muestra de 40 alas se analizan aproximadamente 1,000,000 de células (García Bellido y Dapena, 1974). Se recomienda un total de 120 alas por lote experimental, de tal forma que los resultados sean estadísticamente significativos (Graf *et al.*, 1984).

Los ensayos somáticos de genotoxicidad se encuentran validados con un gran número de agentes químicos y mezclas complejas (más de 400) (Graf *et al.* 1984); se ha empleado con éxito en estudios para la detección de genotoxicidad en plaguicidas (Kaya *et al.*, 2000); y en estudios comparativos entre compuestos análogos (genotóxicos y antígenotóxicos); se ha demostrado su utilidad en la detección de genotoxinas de diferentes fuentes de contaminación (Amaral *et al.*, 2006).

Taurina

El ácido β -aminoetanosulfónico (sinónimos: ácido etanosulfónico, ácido b-aminoetil sulfónico, ácido sulfónico, ácido amino-etano-sulfónico, ácido 2-amino-etano-sulfónico (IUPAC) es un compuesto incoloro y cristalino, con un peso molecular (PM) de 125.15 g/mol, soluble en agua hasta 0.84 g/L, insoluble en metanol y éter. Su fórmula condensada es $C_2H_7NO_3S$.

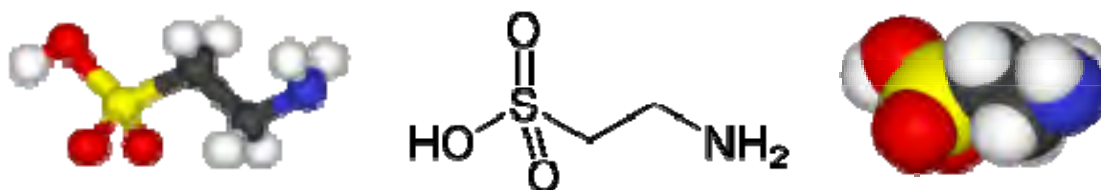


Figura 1. Estructura química de la taurina.

Fue aislada de la bilis de buey, *Bos taurus* del cual se deriva su nombre. Fue descrita por primera vez en 1827 por los científicos alemanes Friedrich Tiedman y Leopold Gmelin. La taurina se consideró un producto final e inerte del metabolismo de los aminoácidos azufrados.

La taurina se encuentra en alimentos consumidos por los humanos (Glass y Czarnecki-Maulden, 1990). Aunque también es un ingrediente en los productos de base animal (Baker, 2006) y se encuentra en mínimas concentraciones en los vegetales (Tabla 1) (Loureco y Camilo, 2002).

Tabla 1. Contenido de taurina en algunos alimentos (Tomada de Loureco y Camilo, 2002)

| Alimento | Taurina (mg/100 g) |
|--|-----------------------|
| Carnes | |
| Res cruda | 43 |
| Cerdo crudo | 61 |
| Pollo crudo/ parte oscura | 169 |
| Pavo crudo/ parte oscura | 306 |
| Cordero crudo/ parte oscura | 47 |
| Jamón horneado | 50 |
| Mariscos | |
| Atún enlatado | 42 |
| Pescado blanco/ crudo | 151 |
| Mejillón/ crudo | 655 |
| Ostras/ frescas | 70 |
| Bacalao/ congelado | 31 |
| Almeja fresca | 240 |
| Almeja enlatada | 152 |
| Leche y derivados | |
| Leche pasteurizada | 6 |
| Queso cheddar | No detectable |
| Yogurt bajo en grasa | 3.3 |
| Helado de vainilla | 1.9 |
| Frutas, vegetales, granos cereales, frijoles y nueces. | No detectable |

Síntesis exógena

La dieta es la principal fuente de taurina en sujetos sanos. Se sintetiza a partir de la metionina y cisteína con la vitamina B₆ (Jacobsen y Smith, 1968; Fontana, 2006).

Tanto la metionina como la cisteína son precursoras de la taurina; sin embargo, la capacidad de síntesis varía ampliamente entre las especies; aún se desconoce la velocidad máxima de síntesis en el humano. La síntesis promedio en los adultos varía entre 0.4 y 1.0 mmol/día (de 50 a 125 mg) (Stapleton *et al.*, 1997).

Síntesis endógena

La síntesis endógena de taurina ocurre principalmente en el hígado y en el cerebro. Ésta requiere varios pasos, como la oxidación enzimática y conversión de cisteína, directamente o después de la conversión de metionina a cisteína (Lambert, 2004).

Las tres enzimas implicadas en esta conversión son la cistationina sintetasa, cistationasa y la descarboxilasa del ácido cisteinsulfínico; todas ellas requieren vitamina B₆ como cofactor.

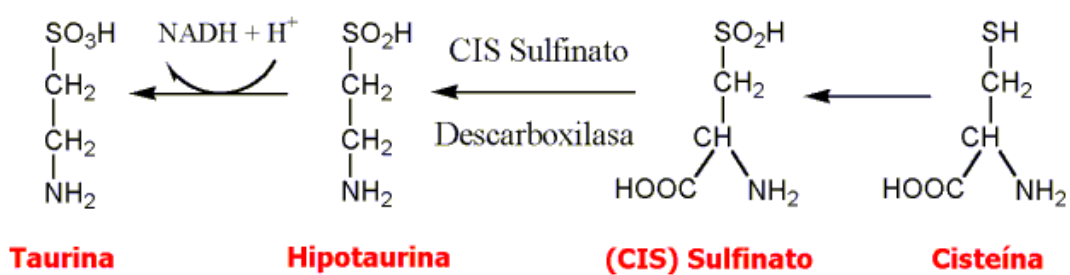


Figura 2. Metabolismo de la taurina a partir de la cisteína.

Distribución

La taurina se encuentra presente en la mayoría de los tejidos de todas las especies animales. Se ha descrito su presencia en todos los Phyla de la escala zoológica, siendo los moluscos los organismos que presentan las concentraciones más elevadas (Jacobsen y Smith, 1968).

La taurina es el aminoácido intracelular más abundante en el cuerpo humano, la mayor parte se encuentra libre y prácticamente no se incorpora a las proteínas; sólo una pequeña cantidad se manifiesta como pequeños péptidos en el cerebro (Jacobsen y Smith, 1968; Stapleton et al., 1997). Un ser humano de aproximadamente 70 kg contiene cerca de 560 mM de taurina (70 g), con concentraciones intracelulares que varían entre 5 y 50 mM, mientras que la concentración plasmática es de casi 100-114 μmol (Jacobsen y Smith, 1968; Engel *et al.*, 2005). Los tejidos que son excitables y que generan radicales libres como la retina, leucocitos, plaquetas, sistema nervioso central, corazón, músculo, médula espinal, cuerpo estriado, pulmón, riñón, vesícula seminal e hígado tienen concentraciones elevadas (Tabla 2) (Jacobsen y Smith, 1968).

Tabla 2. Distribución de taurina en seres humanos (Loureco y Camilo, 2002).

| Tejidos | Peso húmedo ($\mu\text{mol/g}$) | Fluidos | Concentración ($\mu\text{mol/L}$) |
|-------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Cerebro | 0.8-5.3 | Bilis | 200 |
| Eritrocitos | 0.05-0.07 | Liq. Intersticial | 5-36 |
| Corazón | 6 | Leche | 337 |
| Riñón | 1.4-1.8 | Saliva | 16-65 |
| Hígado | 0.3-1.8 | | |
| Pulmón | 1-5 | | |
| Músculo | 2.2-5.4 | | |
| Plaquetas | 16-24 | | |
| Retina | 30-40 | | |
| Bazo | 11.4 | | |
| Leucocitos | 20-35 | | |
| Células | 20-35 | | |

Las concentraciones plasmáticas se mantienen por control homeostático; El plasma es un indicador poco sensible de las concentraciones tisulares individuales; no obstante, refleja el consumo dietario y la excreción urinaria que es rápidamente miscible e intercambiable con una vida media de 0.1 h lo mismo ocurre con la bilis, el sistema nervioso central y otros tejidos, los cuales consumen taurina de forma activa contra un gradiente de concentración. Los almacenes de taurina tienen una baja velocidad de recambio y una vida media de 70 h; sin embargo, todavía no está claro si los almacenes hepáticos actúan como donadores rápidos para el intercambio con otros tejidos. Por ende, el papel primario de la taurina en el hígado es la síntesis de ácidos biliares (Sturman *et al.*, 1975). La taurina viaja activamente hacia todos los tejidos por una proteína transportadora que está acoplada al transporte de iones de sodio y cloro y que está regulada por la activación de dos enzimas sensibles al calcio. La proteincinasa C actúa como inhibidor del transportador y la calmodulina como estimulador del mismo (Honsen, 2001).

Excreción

La taurina se excreta a través de la orina y la bilis; sin embargo, es el riñón el que regula el “pool” corporal total, puesto que controla la reabsorción tubular. La taurina se filtra en los glomérulos y se reabsorbe principalmente en los túbulos de un sistema de transporte específico para aminoácidos de alta afinidad como la metionina que dependen del sodio. La cantidad de taurina que se excreta a diario varía de un individuo a otro, e incluso los niveles de ésta en un individuo pueden cambiar día con día. El intervalo de excreción es de 0.22 a 1.85 mmol y está influido por varios factores como la genética, edad, sexo, consumo dietario, función renal y ciertas condiciones clínicas (Silencio y Montaña, 2004).

Funciones de la taurina

Aunque la taurina no es componente de alguna proteína estructural de mamíferos, desempeña varios papeles fisiológicos importantes incluyendo la osmoregulación, la formación de sales biliares conjugadas (Fontana, 2006) y para la función leucocitaria, la modulación y excitación del sistema nervioso central y el músculo, la proliferación celular, la viabilidad, y la prevención a la oxidación dañina en tejidos (Huxtable, 1992) y como tal, está sujeta al ciclo enterohepático (Van der Hulst *et al.*, 1997).

Los efectos benéficos de la taurina como antioxidante en sistemas biológicos se han atribuido a su capacidad de estabilizar las biomembranas (Wright *et al.*, 1986), de neutralizar especies reactivas del oxígeno (Wright *et al.*, 1985), y de reducir la producción de productos finales de la peroxidación del lípido (Huxtable, 1992).

Los niveles intracelulares de la taurina son mantenidos 50 a 100 veces más altos que las concentraciones extracelulares por transporte activo de la membrana a través del transportador de la taurina (Lambert, 2004). Este gradiente osmótico contribuye al mantenimiento del estado celular de la hidratación y actúa como un regulador de la sal y del equilibrio del agua dentro de las células.

Nutrición e Importancia Clínica

Aunque la taurina no se considera esencial en la nutrición humana, se sugiere que personas estrictamente vegetarianas corren el riesgo de ser deficientes en taurina porque ésta sólo se encuentra en la proteína animal (Mc Carty, 2004).

Además ha sido usada en muchos estudios clínicos para tratar varias condiciones patológicas aunque su mecanismo de acción aun no ha sido comprendido (Cañas, 2002).

La taurina como suplemento en alimentos y bebidas energizantes.

El valor metabólico de la taurina suplemental en sujetos adultos es dudoso porque se ha demostrado que el 70% de taurina suplemental es desechado en la orina sin cambiar y otro 25% es degradado por las bacterias intestinales (Sturman *et al.*, 1975). Debido a sus efectos inotrópicos positivos supuestos, la taurina se ha agregado a las bebidas energizantes (1000 mg/l) sin efectos secundarios aparentes. Se presume que la taurina esté implicada en la estabilización del potencial de la membrana celular y la regulación del transporte a través de varios canales del ion calcio y en el control de la contracción miocardiocelular, razón por la que se añade taurina a las bebidas energizantes (McCarty, 2004).

A pesar de los muchos estudios clínicos; aún no se establece la ingestión diaria recomendada (IDR) y se puede consumir a cualquier hora del día. Actualmente la dosis óptima de taurina no se conoce.

II. JUSTIFICACION

La taurina interfiere en numerosas funciones biológicas y fisiológicas. Su efectividad en diversas patologías se está probando clínicamente; además se considera inocua y no se ha reportado algún efecto negativo asociado a su consumo.

Sin embargo el creciente e indiscriminado consumo por medio de suplementos alimenticios, bebidas energizantes y otros se ha convertido en un problema de salud.

Para evaluar la actividad de una sustancia es conveniente utilizar más de una herramienta de tal manera que el diagnóstico del impacto de la sustancia sea sólido evaluado a través de múltiples variables de respuesta que complementan la caracterización del efecto en diferentes niveles, estructuras o funciones de los organismos expuestos.

OBJETIVO

En este trabajo el objetivo es evaluar el efecto de la taurina sobre la toxicidad, genotoxicidad y reprotoxicidad inducida por la NDMA en *Drososphila melanogaster*.

HIPÓTESIS

La Frecuencia de daño inducido por la NDMA será menor en las moscas tratadas con taurina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos:

La N-Nitrosodimetilamina, se obtuvo de Sigma (CAS 62-75-9). La concentración de la NDMA se seleccionó con base en su potencial mutagénico y recombinogénico en *Drosophila*, en la cual se ha establecido que en larvas expuestas por alimentación a 5 mM en tratamientos agudos se provoca un incremento significativo en la frecuencia de mutación y recombinación somática de los adultos recobrados (Muñoz, 1998). Como testigo se utilizó una solución de sacarosa al 5%.

La taurina fue proporcionada amablemente por la Dra. Herminia Pasantes Morales del Instituto de Fisiología Celular. La concentración de taurina se seleccionó con base en el estudio realizado por Ordaz (1998) en el cual se determinó la concentración letal 50 (que produce la muerte del 50% de las moscas tratadas), LC_{50} en 50 mM. A partir de esta concentración se prepararon soluciones por diluciones sucesivas, hasta obtener las concentraciones finales 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 mM. Como testigo negativo se utilizó agua destilada.

Sistema de cruce

Se utilizaron larvas de 72 ± 4 horas, obtenidas de dos cruces entre diferentes cepas de *Drosophila melanogaster*:

- Canton-S (Cs) larvas de tipo silvestre que provienen de la cruce de machos (Cs) y hembras (Cs); éstas no poseen alteraciones en su constitución genética (marcadores fenotípicos o cromosomas con múltiples inversiones) por lo que son utilizadas como testigo de línea y para la evaluación de la actividad reproductiva de machos tratados.

- larvas transheterocigas flr^3/mwh e y larvas $TM3, Bd^S$ e que provienen de la cruce de machos mwh e / mwh e y hembras $flr^3/TM3, Bd^S$, éstas presentan un cromosoma balanceador que hace viable a los organismos y al contener el marcador Bd^S se pueden distinguir entre las moscas libres y las portadoras del balanceador (moscas con muesca en el borde de las alas y el cuerpo color ébano). En estado larvario ambos tipos de progenie son indistinguibles, por lo que se les trata simultáneamente (Muñoz, 1997).

Durante la metamorfosis las células que constituyen la hoja del ala forman un proceso unicelular (pelo o tricoma), de manera que la cuantificación de pelos o tricomas es equivalente con las células que les dieron origen.

Las alteraciones genéticas causan fenotipos reconocibles en las células de las alas, de manera que en un contexto de tricomas silvestres, pueden observarse manchas con tricomas que expresen el fenotipo flr^3 , mwh o ambos. La recombinación entre los marcadores mwh y flr^3 genera manchas sencillas mwh . Las manchas mwh también pueden originarse por otros eventos genéticos, tales como pérdida, mutación puntual y no disyunción (Graf *et al.*, 1984; Becker, 1976). Por otro lado, la recombinación mitótica entre flr^3 y el centrómero produce manchas gemelas $mwh-flr^3$, por su origen, este tipo de manchas son indicadoras de recombinación. En general, el tamaño de un clon es mayor cuando se induce en larvas jóvenes (24 a 48 h), y de menor tamaño si se producen en larvas de mayor edad (72 o más h); ya que mientras más avanza la edad de la larva se tienen más células blanco que participarán en menos divisiones mitóticas (García Bellido y Merriam, 1971).

El marcador mwh (*multiple wing hair*) se localiza a 0.03 unidades de mapa en el cromosoma 3 y también es autosómico recesivo. Se expresa produciendo numerosos

tricomas en lugar de uno por célula, como en el fenotipo silvestre (Lindsley y Zimm, 1992; Ramos *et al.*, 1993).

El marcador *flr*³ es un marcador fenotípico recesivo localizado a 38.8 unidades de mapa en el brazo izquierdo del cromosoma 3, es codificado por un gen autosómico recesivo, letal en condición homocigótica, pero resulta viable en mutantes somáticos. Para su mantenimiento se requiere del cromosoma balaceador *TM3 Bd*^S *e*. Fenotípicamente produce tricomas en forma de flama (amorfa) sobre la superficie del ala (Lindsley y Zimm, 1992).

El cromosoma balaceador *TM3, Bd*^S *e*, es un cromosoma especialmente construido que tiene múltiples inversiones que generan arreglos sinápticos complejos que por recombinación provocan fragmentos acéntricos, dicéntricos y anillos acéntricos entre otras figuras, por lo que este cromosoma se utiliza para evitar la recuperación de arreglos producidos por recombinación; A un arreglo como el descrito se le denomina sistema de letales balaceados. La presencia del cromosoma balaceador se confirma por la expresión del marcador fenotípico: *Beaded-Serrate (Bd*^S*)* (Lindsley y Zimm, 1992).

Beaded-Serrate (Bd^S*)* se localiza en el cromosoma tres. Es un gen letal dominante que en las moscas heterocigóticas viables produce muescas en el borde de las alas y hace evidente la presencia del cromosoma balaceador (Lindsley y Zimm, 1992).

ebony (e) se localiza a 70.7 unidades de mapa en el cromosoma 3, es un marcador fenotípico recesivo. Las moscas portadoras muestran color ébano y no pardo como en el tipo silvestre (Lindsley y Zimm, 1992).

Elaboración del medio de cultivo para los tratamientos.

El medio de cultivo fue elaborado con base en lo sugerido en Ramos et al (1993), el cual contiene agua (82.56%), carragenina (0.99%), azúcar (4.62%), harina de maíz (6.94%), levadura (4.36%), ácido propiónico (0.26%) y nipagin (0.26%).

Las moscas fueron mantenidas a una temperatura de 25°C y 60% de humedad relativa.

Sincronización de cultivos y obtención de larvas.

Al tercer día de realizada la cruce, los progenitores fueron transferidos a frascos con medio de cultivo fresco para que ovopositaran por un periodo de 8 h (sincronización). Terminado este periodo fueron retirados los progenitores dejando los huevos en el medio hasta desarrollar larvas de 72±4h de edad.

Tratamiento

Las larvas son colectadas mediante una solución concentrada de sacarosa (20%) siguiendo el procedimiento propuesto por Nothinger, 1970. En esta solución, las larvas flotan por tener menor densidad y son vertidas en un embudo de separación de 3 mm de diámetro. Se retiró el exceso de la solución de sacarosa, las larvas se enjuagaron gentilmente con agua corriente a temperatura ambiente y se recibieron en una malla de nylon.

Después de colectadas, se colocaron aproximadamente 100 larvas con una espátula en tubos homeopáticos que tenían una malla de nylon por un extremo y un tapón de hule espuma en el extremo opuesto. Los tubos que contenían a las larvas se introdujeron en un vaso de pp de 10 ml conteniendo 60 mg de celulosa y 5 ml de sacarosa al 5% o de NDMA 5mM por seis horas (tratamiento agudo). La celulosa se utilizó para evitar la evaporación de la solución y al adherirse al cuerpo de la larva contribuye a que la larva

entre en contacto con el compuesto. Posteriormente las larvas se trataron con una solución de taurina (tratamiento crónico).

Para la evaluación del efecto de la taurina sobre la genotoxicidad inducida por la NDMA se desarrollaron dos protocolos. En el primero se exploró si la taurina mostraba actividad genotóxica y en el segundo se determinó si la taurina inhibía la genotoxicidad inducida por la NDMA (Cuadro 3).

| Cuadro 3. Lotes experimentales utilizados en el protocolo de evaluación | |
|---|--------------------------------|
| Tratamiento con Sacarosa al 5% | Agua Destilada = T. Negativo |
| Protocolo A | Taurina a ≠ [] = Experimental |
| Tratamiento con DMNA a 5mM | Agua Destilada = T. Positivo |
| Protocolo B | Taurina a ≠ [] = Experimental |

Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno con dos tubos por concentración, más el testigo correspondiente por protocolo; de cada disolución se registraron un total de 40 alas.

Una vez que emergieron los adultos fueron sacrificados por exceso de éter y fijados en alcohol al 70%, se guardaron en tubos de plástico etiquetados para su identificación.

Determinación del índice de sobrevivencia

Para cada uno de los lotes experimentales, las moscas CS y SMART se cuantificaron de manera independiente por sexo. Sólo las moscas de la craza SMART se cuantificaron por fenotipo: de tipo silvestre, las moscas libres del balanceador (*flr³/mwh* e) y con muescas en las alas y color de cuerpo ébano, las moscas portadoras del

balanceador (*TM3, Bd^s e*). A partir de la cuantificación realizada se calculó el índice de sobrevivencia, con ayuda de la siguiente fórmula:

Índice de sobrevivencia (IS) = Σ adultos experimental / Σ adultos testigo

Con el IS de los lotes experimentales se obtuvo, para cada concentración, un único valor promedio, con su respectivo error estándar. Finalmente el IS promedio obtenido para cada tipo de mosca fue comparado con un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales y el testigo.

Después de obtener el índice de sobrevivencia de todos los experimentos se procedió a separar las alas de las moscas de la craza SMART que presentaban el fenotipo silvestre, con la ayuda de unas pinzas de relojero y se colocaron 10 parejas de alas de hembras y 10 de machos en un portaobjetos con ayuda de solución Fauré (30gr de goma arábica, 20ml de glicerol, 50gr de hidrato de cloral y 50ml de agua) (Graf *et al*, 1984).

Revisión de las alas y criterios de registro

Las alas fueron analizadas con un microscopio óptico a 40X, cada mancha se registró de acuerdo a la sección del ala en la que se encontró: A, B, C, C', D, D', o E, las cuales están delimitadas por la venación natural de las alas; el número de células que la formaban y el fenotipo de la mancha: *mwh*, *flr³* o gemela *mwh-flr³*.

Criterios de lectura

El marcador *mwh* tiene expresividad variable por lo que es posible encontrar en las moscas homocigóticas para esta mutación células que forman 2, 3 o más pelos. Se ha mostrado que los tratamientos con temperatura pueden inducir la formación de fenocopias en las que se observan expresiones con dos tricomas pero no con tres o más

(Katz, 1985), por esta razón sólo se cuantifican como manchas *mwh* aquellas que contengan al menos una célula o con tres o más pelos.

Se considera que dos manchas son independientes si se separan entre si por 3 o más hileras de tricomas silvestres. Por el plano de división de las células que forman el ala (paralelo con respecto al eje longitudinal de la misma), las manchas ubicadas en la región dorsal son independientes de las observadas en la región ventral del ala (Graf *et al.*, 1984).

Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Wurgler, (1988) para determinar si existían diferencias significativas entre la frecuencia de mutación y recombinación somática en los lotes experimentales y el testigo. Los datos fueron analizados con la ayuda del programa de cómputo SMART y se basan en la prueba no paramétrica de X^2 . El nivel de ensayo se fija en $\alpha=0.05$. Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeterminado con base en las siguientes dos hipótesis: la hipótesis nula (H_0) que indica que la frecuencia de las mutaciones inducidas y espontáneas no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo y la hipótesis (H_a) señala que la frecuencia de manchas inducidas sea **m** veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984), donde **m**, es el factor de multiplicación utilizado para realizar este análisis estadístico, indicando cuántas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva. Las manchas chicas (de 1 a 2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (>3 células) y la de manchas gemelas, por lo que deben analizarse por separado para evitar

una sobreestimación de la inducción de las manchas menos comunes. De esta manera para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas chicas y totales (se obtiene de la suma de todas las manchas, por lo que la contribución de las manchas chicas es predominante) se utiliza $m=2$, mientras que para las manchas grandes y las gemelas $m=5$. Las siguientes cuatro decisiones son posibles (Frei y Wurgler, 1988):

1. No rechazar la H_0 y rechazar H_a : negativo
2. Rechazar H_0 y no rechazar H_a : positivo
3. Rechazar H_0 y rechazar H_a : débil positivo
4. No rechazar H_0 y no rechazar h_a : indeterminado

Determinación de la actividad reproductiva

Se utilizaron larvas de 72 ± 4 horas, obtenidas a partir de la cruce entre hembras y machos tipo silvestre. Estas moscas no poseen alteraciones en su constitución genética (marcadores fenotípicos o cromosomas con múltiples inversiones).

Las larvas se expusieron al tratamiento descrito anteriormente; posteriormente se seleccionaron 40 machos de ambos experimentos (protocolo A 20 y protocolo B 20) por cada dilución de taurina más el testigo correspondiente por protocolo.

Cada macho tratado se cruzó con 2 hembras vírgenes silvestres en tubos homeopáticos con medio de cultivo fresco. Después de cinco días se eliminaron los progenitores del frasco y se esperó a que la progenie emergiera.

Finalmente se contaron por sexo todas las moscas que emergieron de los dos experimentos realizados con repetición independiente. Con la información obtenida se obtuvieron el índice de fertilidad y el promedio de la progenie por macho. Se graficaron

los promedios de la progenie producida por cada grupo de 20 machos tratados, por concentración en cada experimento (Tabla 4).

El índice de fertilidad (IFr) se calculó con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$\text{IFr} = \text{Número de machos con progenie por conc} / \text{Número de machos sembrados}$$

El IFr permite identificar cambios producidos por los tratamientos probados en la capacidad reproductiva de los organismos.

El promedio de la progenie por macho (PPM) se obtuvo con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$\text{PPM} = \text{Total de individuos de la } F_1 \text{ por conc} / \text{Número de machos fértiles por concentración.}$$

El promedio de la progenie por macho es un biomarcador que permite identificar si las alteraciones trascienden a la siguiente generación.

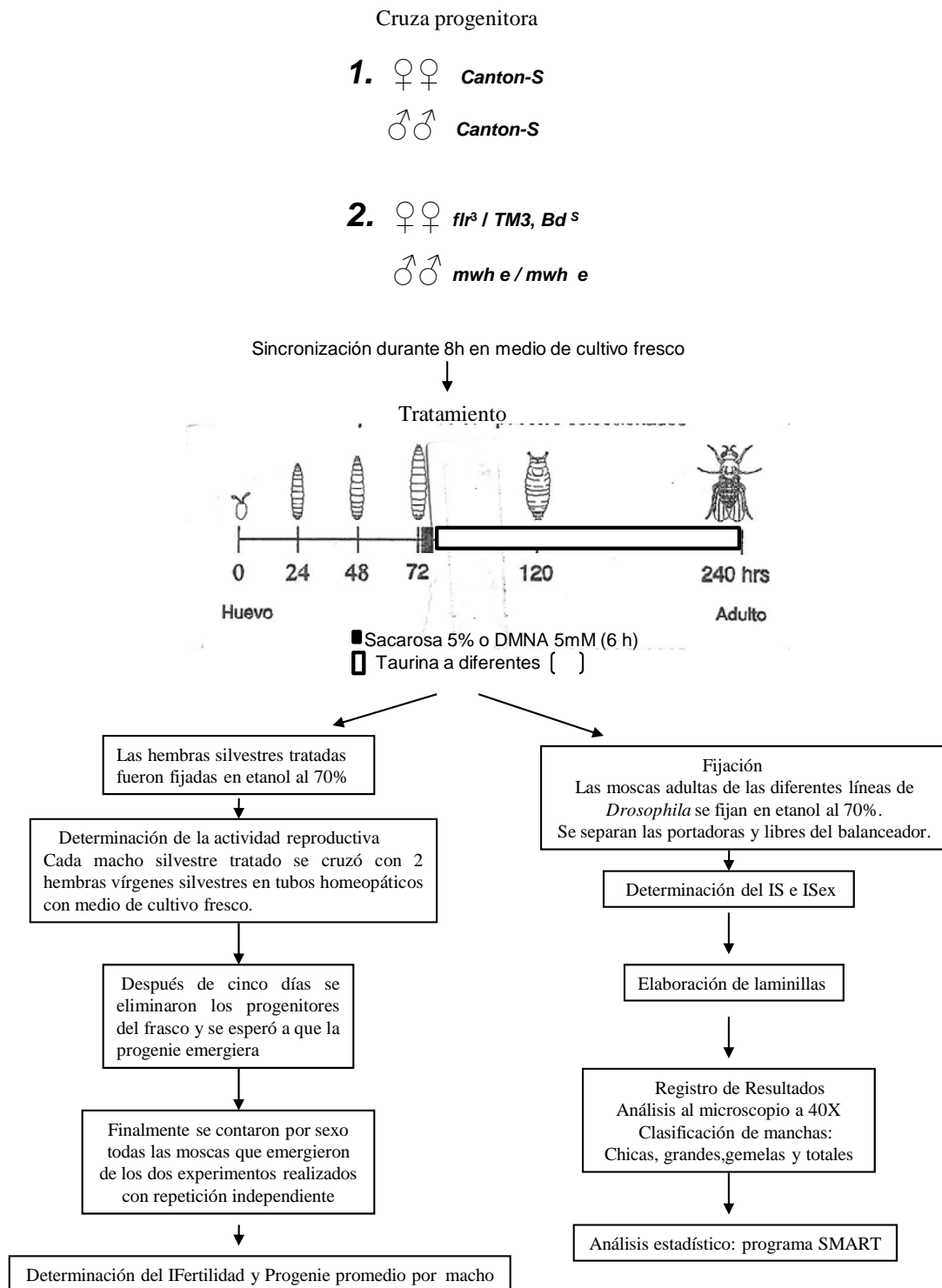


Tabla 4. Diseño Experimental utilizado para evaluar el efecto de la taurina sobre la toxicidad de la N-nitrosodimetilamina en *Drosophila melanogaster*.

IV. RESULTADOS.

Índice de Supervivencia (IS) e Índice Sexual (ISex).

Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno con dos tubos por concentración. Se calculó el índice de supervivencia (IS) para cada tubo y se obtuvo el IS promedio del experimento. Posteriormente se promediaron los IS obtenidos por concentración y por experimento para obtener el promedio de los promedios de los experimentos realizados por cada tratamiento: Sacarosa 5% + Taurina (Tabla 5) o NDMA 5mM + Taurina (Tabla 6).

Tabla 5. Índice de Supervivencia (IS) de moscas tratadas con Sacarosa 5% + Taurina.

| [] mM | canton-s | flr ³ /mwhe | TM3, Bd ^S /mwhe |
|---------|-------------|------------------------|----------------------------|
| Taurina | IS ± E. S. | IS ± E. S. | IS ± E. S. |
| 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 |
| 0,01 | 1,06 ± 0,14 | 0,99 ± 0,09 | 0,53 ± 0,02 |
| 0,05 | 1,12 ± 0,22 | 0,57 ± 0,15 | 0,67 ± 0,28 |
| 0,10 | 0,86 ± 0,21 | 0,82 ± 0,34 | 0,61 ± 0,11 |
| 0,50 | 0,87 ± 0,15 | 0,97 ± 0,61 | 0,59 ± 0,08 |
| 1,00 | 1,07 ± 0,19 | 0,76 ± 0,50 | 0,61 ± 0,22 |
| 5,00 | 1,14 ± 0,21 | 1,42 ± 1,08 | 0,84 ± 0,55 |
| 10,00 | 1,35 ± 0,19 | 0,61 ± 0,47 | 0,69 ± 0,42 |
| 50,00 | 0,06 ± 0,02 | 0,09 ± 0,07 | 0,11 ± 0,00 |

Tabla 6. Índice de Supervivencia (IS) de moscas tratadas con NDMA 5mM + Taurina.

| [] mM | canton-s | flr ³ /mwhe | TM3, Bd ^S /mwhe |
|---------|-------------|------------------------|----------------------------|
| Taurina | IS ± E. S. | IS ± E. S. | IS ± E. S. |
| 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 |
| 0,01 | 1,04 ± 0,31 | 0,78 ± 0,60 | 0,78 ± 0,62 |
| 0,05 | 0,89 ± 0,25 | 0,53 ± 0,35 | 0,69 ± 0,51 |
| 0,10 | 1,13 ± 0,18 | 1,92 ± 0,33 | 1,21 ± 0,89 |
| 0,50 | 0,82 ± 0,28 | 1,18 ± 0,95 | 1,05 ± 0,95 |
| 1,00 | 0,97 ± 0,32 | 0,79 ± 0,34 | 0,70 ± 0,40 |
| 5,00 | 1,04 ± 0,40 | 1,20 ± 0,07 | 0,81 ± 0,09 |
| 10,00 | 1,00 ± 0,29 | 0,94 ± 0,06 | 1,22 ± 0,38 |
| 50,00 | 0,18 ± 0,07 | 0,51 ± 0,13 | 0,63 ± 0,13 |

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) de dos criterios para discernir si existían diferencias significativas entre los IS de cada concentración probada al tratar las larvas previamente con Sacarosa al 5% o NDMA 5 mM respectivamente por experimento y a su vez dentro de las diferentes líneas utilizadas. El ANOVA, $p = 0.05$ de dos vías para el IS sólo mostró diferencias significativas en la concentración utilizada.

Posteriormente se realizó un ANOVA, $p = 0.05$ de dos vías que incluyó el análisis de la concentración y del compuesto para cada una de las líneas utilizadas; sólo se encontraron diferencias significativas dentro de la línea silvestre por lo que se realizó la prueba de Tukey para conocer cuál era la concentración significativamente distinta. Se confirmó que la supervivencia recobrada a 50 mM resultó ser significativamente diferente, por lo que se separaron usando grupos homogéneos (Tabla 7).

Tabla 7. Prueba de Tukey (Canton).

| [] mM | Mean | 1 | 2 |
|---------------|--------------|------|-------------|
| Taurina | | | |
| 50.0mM | 0.121 | xxxx | |
| 0.5mM | 0.846 | | xxxx |
| 0.1mM | 0.991 | | xxxx |
| 0.00mM | 1,000 | | xxxx |
| 0.05mM | 1,008 | | xxxx |
| 1.0mM | 1,015 | | xxxx |
| 0.01mM | 1,045 | | xxxx |
| 5.0mM | 1,089 | | xxxx |
| 10.0 mM | 1,176 | | xxxx |

Las figuras 3 y 4 muestran los Índices de Supervivencia (IS) de las moscas expuestas a tratamiento.

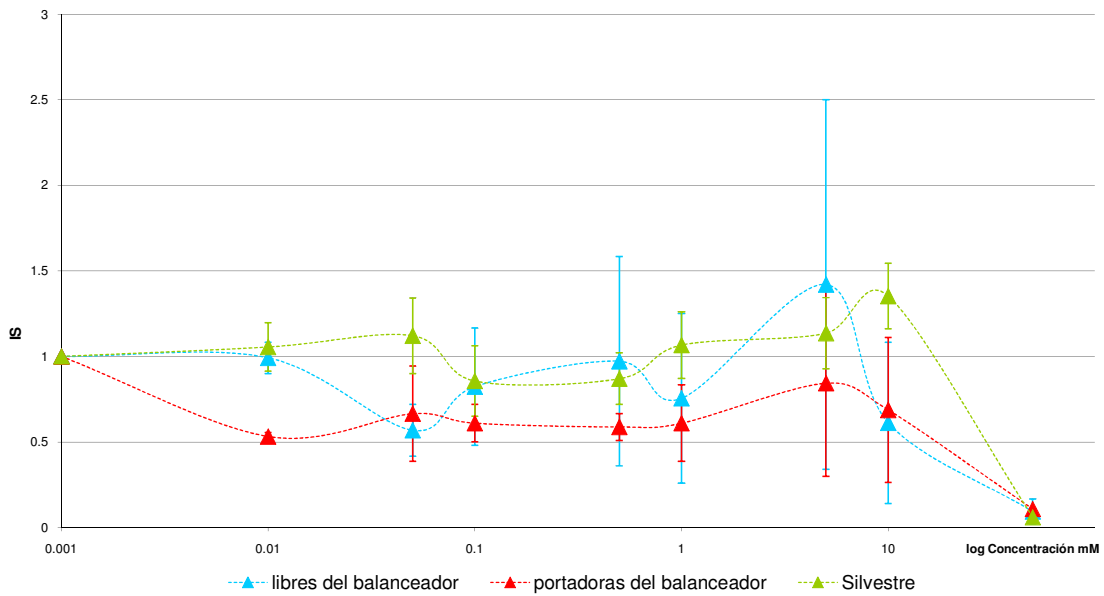


Figura 3. Índice de supervivencia (IS) promedio de larvas tratadas con Sacarosa 5% + Taurina

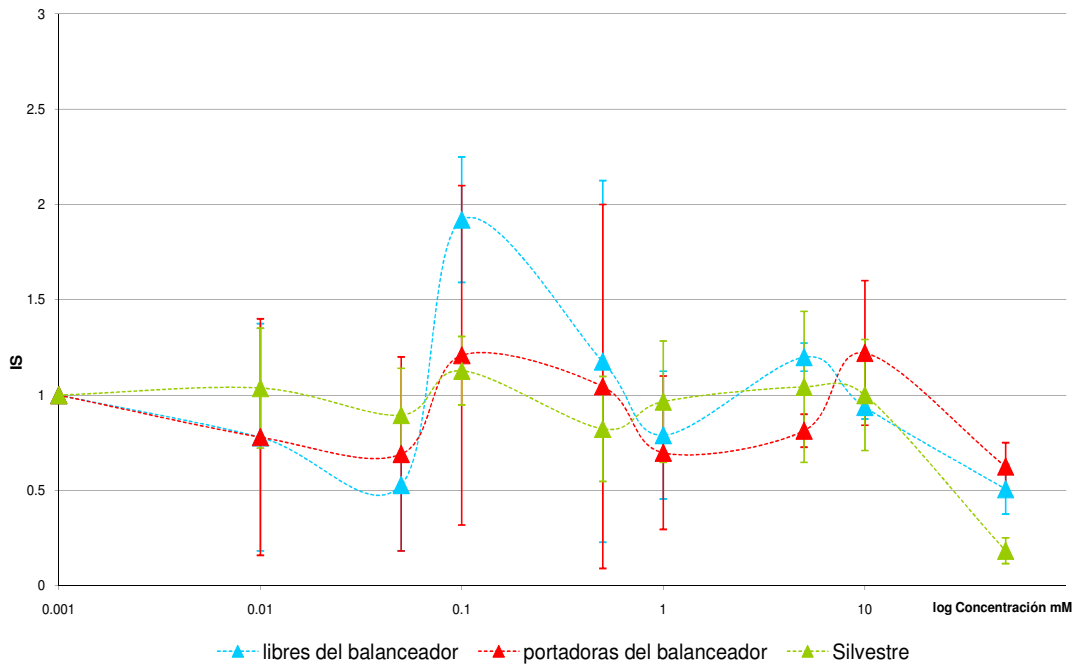


Figura 4. Índice de Supervivencia (IS) promedio de larvas tratadas con NDMA 5 mM + Taurina.

Para calcular el Índice Sexual (ISx) promedio se siguió el procedimiento descrito anteriormente para el IS pero en este índice se consideró sólo la supervivencia de los machos. Las tablas 8 y 9 muestran los ISx de los machos recobrados en las tres líneas de moscas utilizadas, los cuales fueron tratados previamente con Sacarosa 5% o con NDMA, respectivamente.

Tabla 8. Índice sexual (ISex) de machos tratados con Sacarosa 5% + Taurina.

| [] mM | canton-s | flr ³ /mwhe | TM3, Bd ^S /mwhe |
|---------|--------------|------------------------|----------------------------|
| Taurina | ISex ± E. S. | ISex ± E. S. | ISex ± E. S. |
| 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 |
| 0,01 | 1,18 ± 0,21 | 0,75 ± 0,05 | 0,52 ± 0,02 |
| 0,05 | 1,40 ± 0,24 | 0,49 ± 0,29 | 0,77 ± 0,40 |
| 0,10 | 1,22 ± 0,35 | 1,00 ± 0,80 | 0,72 ± 0,22 |
| 0,50 | 1,07 ± 0,36 | 1,31 ± 0,89 | 0,58 ± 0,00 |
| 1,00 | 1,28 ± 0,25 | 0,78 ± 0,62 | 0,66 ± 0,17 |
| 5,00 | 1,32 ± 0,22 | 1,93 ± 1,67 | 0,66 ± 0,42 |
| 10,00 | 1,52 ± 0,28 | 0,76 ± 0,64 | 0,65 ± 0,35 |
| 50,00 | 0,08 ± 0,07 | 0,22 ± 0,18 | 0,10 ± 0,02 |

Tabla 9. Índice sexual (ISex) de machos tratados con NDMA 5mM + Taurina.

| [] mM | canton-s | flr ³ /mwhe | TM3, Bd ^S /mwhe |
|---------|--------------|------------------------|----------------------------|
| Taurina | ISex ± E. S. | ISex ± E. S. | ISex ± E. S. |
| 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 |
| 0,01 | 0,87 ± 0,25 | 1,79 ± 1,71 | 0,65 ± 0,49 |
| 0,05 | 0,83 ± 0,19 | 0,86 ± 0,64 | 0,33 ± 0,09 |
| 0,10 | 0,84 ± 0,13 | 2,79 ± 1,21 | 0,91 ± 0,67 |
| 0,50 | 0,73 ± 0,16 | 1,64 ± 1,36 | 0,75 ± 0,67 |
| 1,00 | 0,91 ± 0,28 | 1,79 ± 1,21 | 0,72 ± 0,28 |
| 5,00 | 0,90 ± 0,28 | 2,11 ± 0,89 | 0,78 ± 0,06 |
| 10,00 | 0,88 ± 0,17 | 1,39 ± 0,61 | 1,20 ± 0,52 |
| 50,00 | 0,17 ± 0,07 | 0,54 ± 0,04 | 0,46 ± 0,18 |

Las figuras 5 y 6 muestran los Índices Sexuales (ISex) de las moscas macho expuestas a tratamiento.

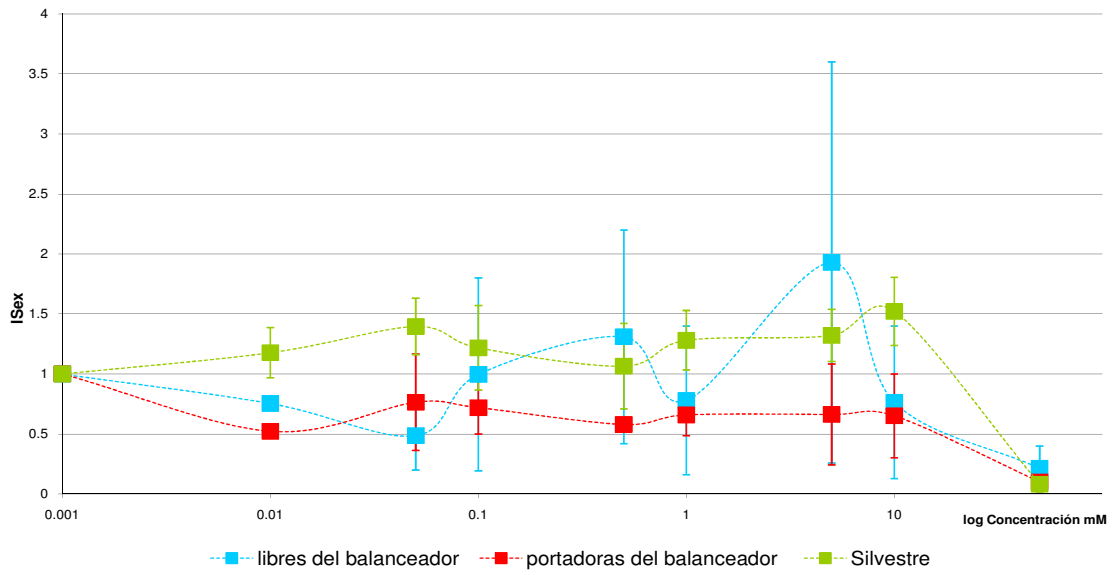


Figura 5. Índice Sexual (ISex) de machos tratados con Sacarosa 5% + Taurina

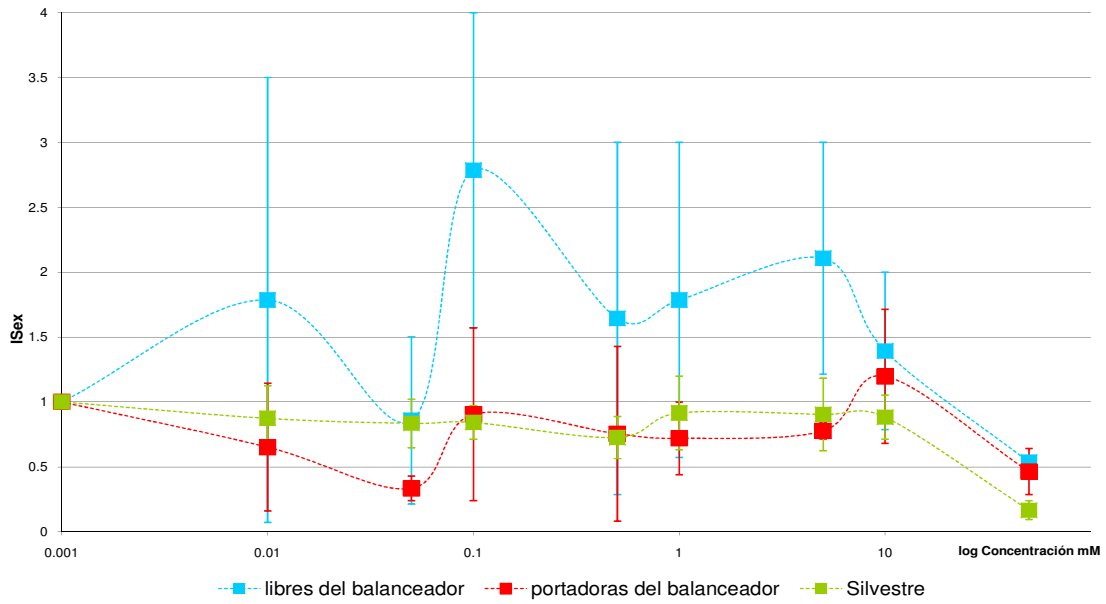


Figura 6. Índice Sexual (ISex) de machos tratados con NDMA 5mM + Taurina.

Al analizar el efecto de la Sacarosa 5% + Taurina por línea se observó que el IS de las moscas de tipo silvestre es similar en las diferentes concentraciones, manteniéndose alrededor del grupo testigo. En las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 y 10.0 mM se recobraron IS mayores en comparación a los obtenidos con las moscas libres y portadoras de inversiones.

En las moscas libres de inversiones se obtuvieron IS más altos en las concentraciones 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mM en comparación con las moscas portadoras de inversiones en las que los IS mayores corresponden a las concentraciones 0.05 y 10.0 mM; aunque en estas moscas el IS fue el más bajo al comparar las tres líneas entre sí. En general, la concentración 50.0 mM de taurina resultó tóxica para las moscas de cualquier tipo.

Al analizar el ISx de machos tratados con Sacarosa 5% + Taurina se observó que todas las líneas de moscas tratadas se comportaron diferente con respecto a la concentración de taurina utilizada.

En las moscas de tipo silvestre, el tratamiento con Sacarosa 5% + Taurina incrementó el ISx en las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 10.0 mM en comparación con las líneas libres y portadoras del balanceador.

En la línea libre del balanceador, el ISex de machos es mayor en las concentraciones 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 y 50.0 mM en comparación con la línea portadora del balanceador.

En la línea portadora del balanceador, sólo se recobraron más machos en la concentración 0.05 mM en comparación con la línea libre del balanceador; aunque el ISex en general fue el más bajo al comparar las tres líneas entre sí.

Al analizar el efecto de la NDMA 5 mM + Taurina se observó disminución en el número de moscas recobradas en comparación con las moscas que fueron tratadas con Sacarosa 5% + Taurina.

En las moscas de tipo silvestre, se obtuvieron IS más altos en las concentraciones 0.01, 0.05, 1.0 y 10.0 mM, en comparación con las moscas libres y portadoras de inversiones.

En las moscas libres de inversión, los IS más altos se obtuvieron en las concentraciones 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mM en comparación con las portadoras de inversiones en los que los IS mayores correspondieron a las concentraciones 0.01, 0.05, 10.0 y 50 mM. También en estos experimentos, la concentración más alta (50 mM) de taurina resultó tóxica para las moscas de cualquier tipo.

Al analizar el ISx de machos tratados con NDMA 5mM + Taurina se observó que en la línea silvestre, el tratamiento recobró menos moscas macho en todas las concentraciones utilizadas de taurina en comparación con el grupo testigo de la misma línea.

En la línea libre del balanceador, el ISex de machos es mayor en las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 y 50.0 mM en comparación con la línea portadora del balanceador.

En la línea portadora del balanceador, se recobraron menos moscas macho en las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 50.0 mM en comparación con el grupo testigo de la misma línea.

En todas las líneas la concentración 50.0 mM de taurina resultó tóxica para las moscas.

Actividad reproductiva (progenie por macho tratado)

Se realizaron dos experimentos, cada uno con dos tubos por concentración. Para obtener este parámetro de las moscas silvestres se contó el número de hijos por macho tratado para cada tubo y se promediaron para obtener la actividad reproductiva por concentración. Posteriormente se sumaron los datos obtenidos por concentración y por experimento para cada tratamiento: Sacarosa 5% + Taurina o NDMA 5mM + Taurina (Tabla 9 y Figura 7).

La progenie resultó significativamente diferente, al realizar un análisis de varianza de dos vías para concentración y compuesto, el cual no indicó diferencias entre los tratamientos ni entre la concentración utilizados ($p > 0.05$).

Al analizar el efecto del tratamiento de Sacarosa 5% + Taurina en el número de hijos de los machos tratados se observó que la actividad reproductiva se mantenía muy similar en las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mM con respecto al testigo y finalmente 50.0 mM en la cual fue menor.

Al analizar el efecto de la NDMA 5mM + Taurina en el número de hijos de los machos tratados se observó disminución en las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 50.0 mM con respecto al testigo; comparado con la concentración 10.0 mM en la que la progenie recobrada fue más numerosa.

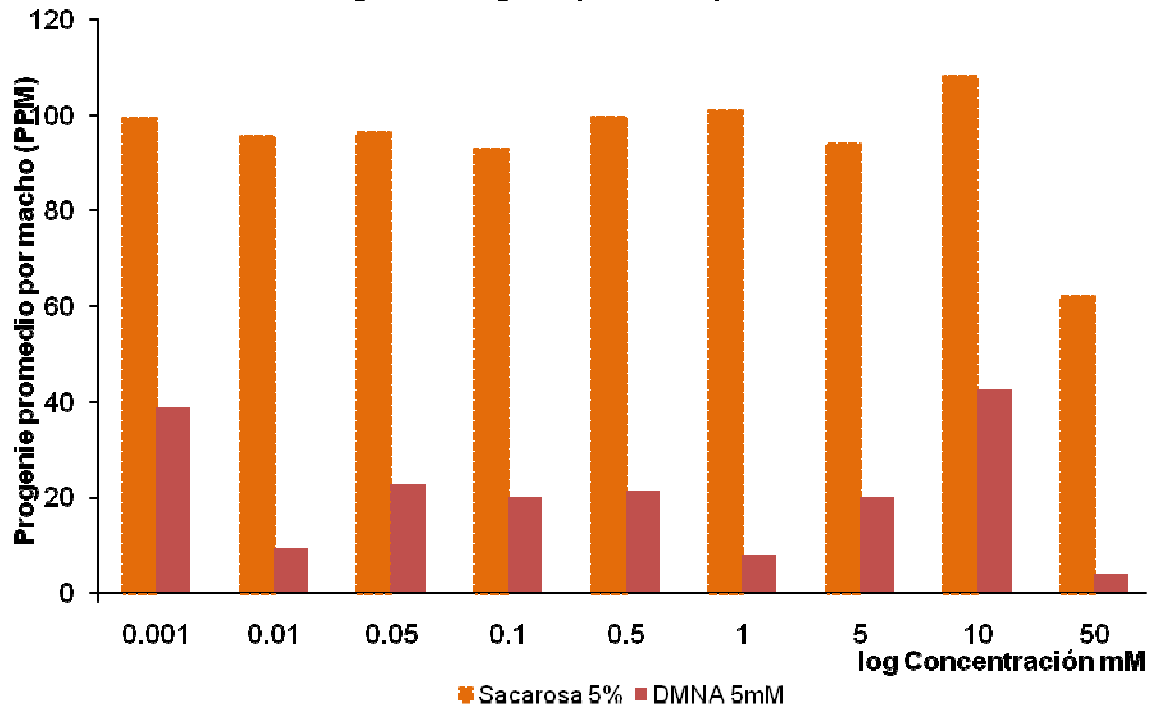
La progenie por macho de los machos tratados con NDMA 5mM + Taurina fue menor en todas las concentraciones a la producida por los machos tratados con Sacarosa 5% + Taurina.

Tabla 9. Progenie promedio por macho (PPM)

[] mM

| Taurina | Sac 5% ± E. S. | NDMA ± E. S. |
|---------|----------------|---------------|
| 0,00 | 49.62 ± 7.73 | 19.35 ± 5.85 |
| 0,01 | 47.81 ± 6.44 | 4.72 ± 4.72 |
| 0,05 | 48.17 ± 9.33 | 11.36 ± 0.36 |
| 0,10 | 46.41 ± 5.01 | 9.98 ± 2.53 |
| 0,50 | 49.79 ± 7.64 | 10.68 ± 0.68 |
| 1,00 | 50.49 ± 7.14 | 3.94 ± 3.94 |
| 5,00 | 46.97 ± 1.08 | 9.95 ± 5.05 |
| 10,00 | 54.10 ± 3.10 | 21.22 ± 12.28 |
| 50,00 | 31.00 ± 31.00 | 2.00 ± 2.00 |

Figura 7. Progenie promedio por macho



Índice de fertilidad (IFr)

Se realizaron dos experimentos, cada uno con dos tubos por concentración. Para obtener este parámetro de las moscas silvestres se contó el número de machos con progenie por concentración y se dividió entre el número de machos que se sembraron por tubo para cada concentración.

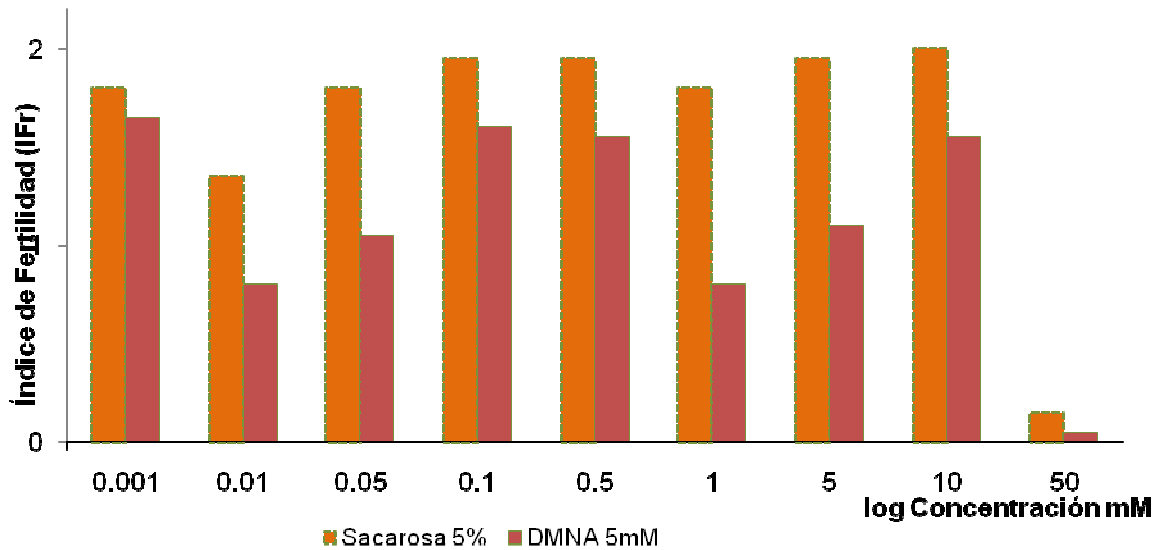
Posteriormente se sumaron los datos obtenidos por concentración y por experimento para cada tratamiento: Sacarosa 5% + Taurina o NDMA 5mM + Taurina (Tabla 10 y Figura 8).

El índice de fertilidad de los machos tratados con NDMA 5mM + Taurina fue menor en todas las concentraciones comparados con el índice de fertilidad de los machos tratados con Sacarosa 5% + Taurina.

Tabla 10. Índice de Fertilidad (IFr)

| [] mM Taurina | Sac 5% ± E. S. | NDMA ± E. S. |
|-------------------|----------------|--------------|
| 0,00 | 0.900 ± 0.05 | 0.83 ± 0.08 |
| 0,01 | 0.675 ± 0.28 | 0.40 ± 0.40 |
| 0,05 | 0.900 ± 0.00 | 0.53 ± 0.18 |
| 0,10 | 0.975 ± 0.02 | 0.80 ± 0.20 |
| 0,50 | 0.975 ± 0.02 | 0.78 ± 0.23 |
| 1,00 | 0.900 ± 0.10 | 0.40 ± 0.40 |
| 5,00 | 0.975 ± 0.02 | 0.55 ± 0.40 |
| 10,00 | 1.000 ± 0.00 | 0.78 ± 0.18 |
| 50,00 | 0.075 ± 0.08 | 0.03 ± 0.03 |

Figura 8. Índice de Fertilidad (IFr)



Frecuencia de Mutación

El análisis cuantitativo de la frecuencia de manchas inducidas en larvas de *Drosophila melanogaster* por tratamientos con Sacarosa 5% + Taurina, se muestra en la tabla 11, figura 9 y 10.

Las larvas de 72h tratadas con sacarosa al 5% durante 6 horas y la administración de taurina incrementaron la frecuencia de manchas simples chicas y totales en las concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 10 mM. No hubo respuesta significativa en la inducción de manchas simples grandes aunque se observó un ligero incremento en las concentraciones 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 mM,

En la respuesta obtenida en el tratamiento de las moscas con Sacarosa 5% + Taurina, la frecuencia de manchas simples chicas y totales se incrementó principalmente en las concentraciones inferiores a 0.5 mM; además de resultar tóxica para las larvas ya que al incrementar la concentración de taurina a 50mM la cantidad de moscas recobradas

disminuyó drásticamente, además de que en esta concentración, la frecuencia total de manchas es ligeramente menor a la de las moscas testigo.

En las concentraciones iguales o superiores a 1.0mM la distribución de todas las manchas resultó similar a la del lote testigo a excepción de 10mM en la que se incrementó la frecuencia de manchas simples chicas y totales.

Tabla 11. Número y frecuencia de manchas inducidas en el ala con diferentes concentraciones de taurina en larvas de 72 horas de edad. Exposición: 72 X 6 hr (Sacarosa 5%) X 48 hr (Taurina).

| Taurina | Manchas por ala (Núm. de manchas) | | | | | Núm. de clones mwh | Clase clonal prom. | Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻⁵ | |
|---------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--|------------|
| | Núm. De alas | Manchas Simples Chicas (1-2 cels) m=2 | Manchas Simples Grandes (>2 cels) m=5 | Manchas gemelas m=5 | Manchas Totales m=2 | | | Observa | Corre-Gida |
| 0 | 40 | 0.25 (10) | 0.08 (3) | 0.00 (0) | 0.32 (13) | 13 | 2.08 | 1.3 | |
| 0.01mM | 40 | 2.03 (81) + | 0.08 (3) i | 0.00 (0) i | 2.10 (84) + | 84 | 1.15 | 8.6 | 7.3 |
| 0.05mM | 40 | 0.73 (29) + | 0.03 (1) - | 0.00 (0) i | 0.75 (30) + | 30 | 1.13 | 3.1 | 1.7 |
| 0.1mM | 40 | 4.25 (170) + | 0.17 (7) i | 0.00 (0) i | 4.43 (177) + | 177 | 1.13 | 18.2 | 16.8 |
| 0.5mM | 40 | 0.60 (24) + | 0.08 (3) i | 0.00 (0) i | 0.68 (27) + | 27 | 1.44 | 2.8 | 1.4 |
| 1.0mM | 40 | 0.28 (11) i | 0.15 (6) i | 0.00 (0) i | 0.43 (17) i | 17 | 2 | 1.7 | 0.4 |
| 5.0mM | 38 | 0.39 (15) i | 0.16(6) i | 0.00 (0) i | 0.55 (21) i | 21 | 1.86 | 2.3 | 0.9 |
| 10.0mM | 38 | 0.71 (27) + | 0.11 (4) i | 0.00 (0) i | 0.82 (31) + | 31 | 1.55 | 3.3 | 2 |
| 50mM | 4 | 0.25 (1) i | 0.00 (0) i | 0.00 (0) i | 0.25 (1) i | 1 | 1 | 1 | -0.3 |

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988). +, positivo; -, negativo; i, indeterminado; w, débil positivo; con un nivel de probabilidad: alfa=beta=0.05.

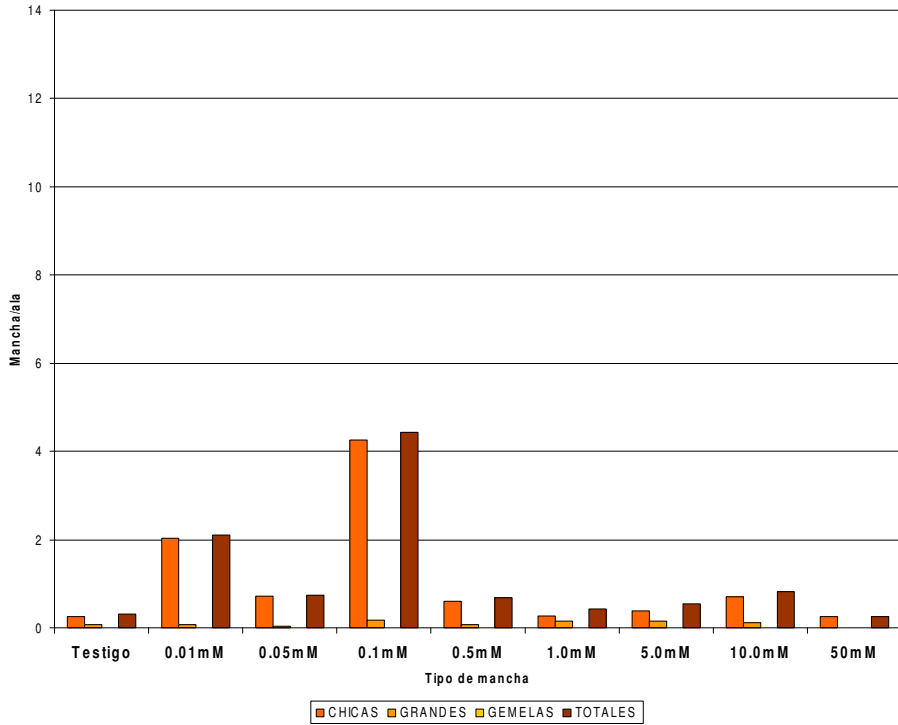


Figura 9. Tipo de manchas por ala inducidas en larvas de tercer estadio (72hr) tratadas con sacarosa 5% por 6hr y con diferentes concentraciones de taurina por 48hr.

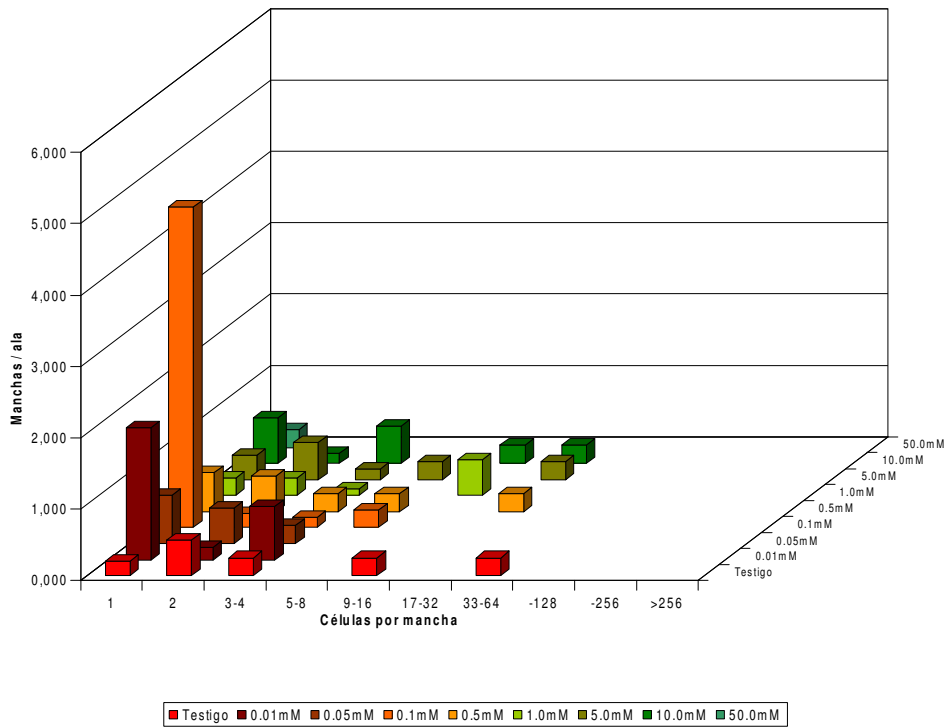


Figura 10. Células por mancha inducidas en larvas de tercer estadio (72hr) tratadas con sacarosa 5% por 6hr y con diferentes concentraciones de taurina por 48hr.

La frecuencia de manchas inducidas en larvas de *Drosophila melanogaster* por DMN 5mM y Taurina, se muestra en la tabla 12, figura 11 y 12.

En larvas de 72 h, el tratamiento con DMN durante 6 horas y la administración de Taurina arrojó resultados diferentes.

La frecuencia total de cada tipo de mancha recobrada en los lotes experimentales fue mayor en las moscas tratadas con NDMA 5mM en comparación de las moscas tratadas con Sacarosa 5% + Taurina.

La inducción de manchas simples chicas y totales en todas las concentraciones utilizadas resultó negativa. La inducción de manchas simples grandes tuvo un diagnóstico débil positivo para las concentraciones 0.01 mM y negativo para el resto.

El aumento en la frecuencia de manchas gemelas sólo resultó positivo en la concentración 5.0 mM.

El mayor promedio de la clase clonal se obtuvo a 0.05 mM (2.53) y se obtuvo la mayor inducción de clones en las concentraciones 0.01 (4.8) y 0.1 mM (6.2).

Tabla 12. Número y frecuencia de manchas inducidas en el ala con diferentes concentraciones de taurina en larvas de 72 horas de edad. Exposición: 72 X 6 hr (DMN 5mM) X 48 hr (Taurina).

| Taurina | Núm. De alas | Manchas por ala (Núm. de manchas) Diagnóstico estadístico* | | | | Núm. de clones mwh | Clase clonal prom. | Frecuencia de formación de clones X | Observed | Corre-Gida |
|---------|--------------|---|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------------|----------|------------|
| | | Manchas simples chicas (1-2 cels) m=2 | Manchas simples grandes (>2 cels) m=5 | Manchas gemelas m=5 | Manchas totales m=2 | | | | | |
| 0 | 40 | 6.28 (251) | 4.15 (166) | 0.28 (11) | 10.70 (428) 11.73 (305) | 422 | 2.3 | 43.3 | | |
| 0.01mM | 26 | 7.81 (203) - | 3.92 (102) - | 0.00 (0) - | - | 305 | 2.13 | 48.1 | 4.8 | |
| 0.05mM | 20 | 3.15 (63) - | 2.80 (56) - 5.47 (219) | 0.00 (0) - 0.60 (24) | 5.95 (119) - 12.30 (492) | 119 | 2.53 | 24.4 | -18.9 | |
| 0.1mM | 40 | 6.22 (249) - | w | w | - | 482 | 2.5 | 49.4 | 6.2 | |
| 0.5mM | 36 | 4.53 (163) - | 3.56 (128) - | 0.00 (0) - | 8.08 (291) - | 290 | 2.42 | 33 | -10.2 | |
| 1.0mM | 36 | 4.36 (157) - | 2.28 (82) - | 0.00 (0) - | 6.64 (239) - 10.00 (400) | 237 | 2.12 | 27 | -16.3 | |
| 5.0mM | 40 | 5.97 (239) - | 3.15 (126) - | 0.87 (35) + | - | 376 | 2.13 | 38.6 | -4.7 | |
| 10.0mM | 40 | 4.85 (194) - | 3.53 (141) - | 0.15 (6) - | 8.52 (341) - | 336 | 2.41 | 34.5 | -8.8 | |
| 50.0mM | 24 | 5.29 (127) - | 3.46 (83) - | 0.00 (0) - | 8.75 (210) - | 210 | 2.32 | 35.9 | -7.4 | |

* Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). +, positivo; -, negativo; i, indeterminado; w, débil positivo; con un nivel de probabilidad: alfa=beta=0.05.

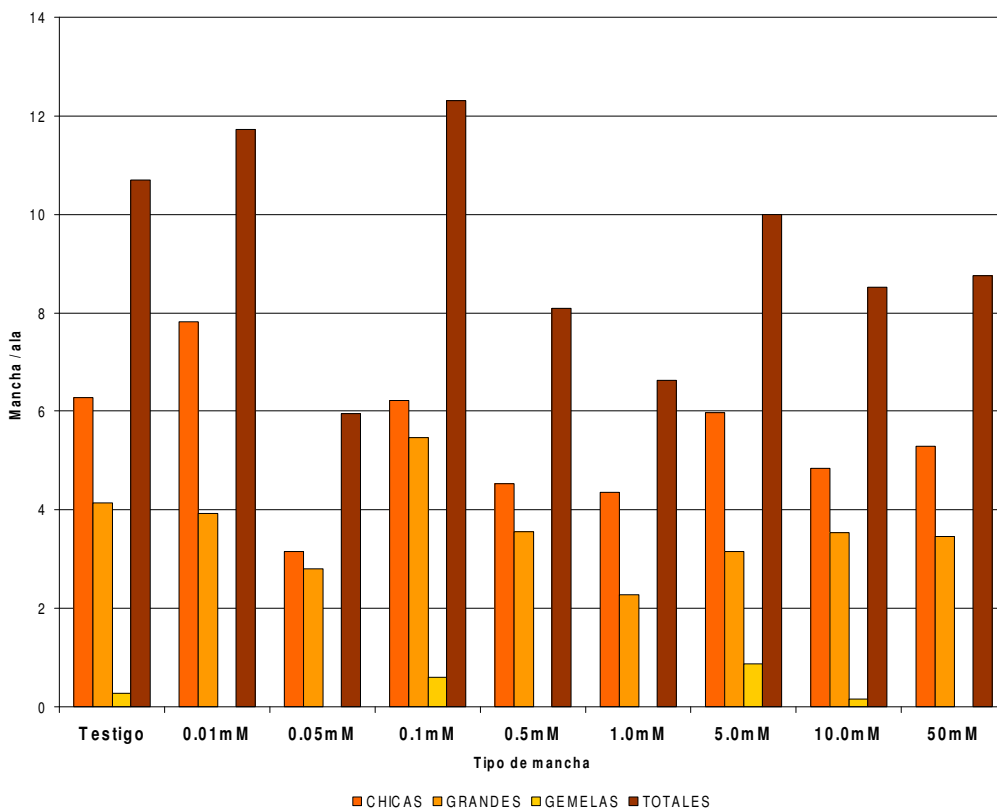


Figura 11. Tipo de manchas por ala inducidas en larvas de tercer estadio (72hr) tratadas con DMN 5mM por 6hr y con diferentes concentraciones de taurina por 48hr.

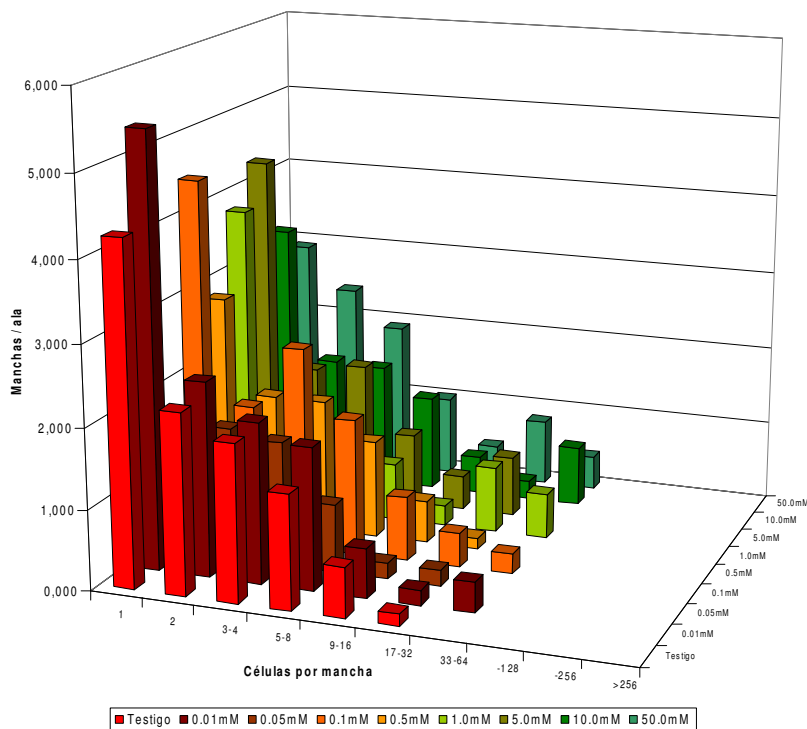


Figura 12. Células por mancha inducidas en larvas de tercer estadio (72hr) tratadas con DMN 5mM por 6hr y con diferentes concentraciones de taurina por 48hr.

V. DISCUSIÓN

La exposición de los seres humanos a sustancias potencialmente reactivas presentes en el ambiente es frecuente; esta exposición puede ocurrir por períodos prolongados y con mayor frecuencia incluye concentraciones mínimas que son capaces de provocar efectos a corto, mediano y largo plazo, por lo que se dificulta la detección del impacto.

Actualmente, el consumo indiscriminado de suplementos alimenticios y bebidas energizantes que contienen sustancias “naturales” ha propiciado un consumo creciente en la población sin importar edad, sexo, estado de salud, condición social.

Una de las sustancias “naturales” que más frecuentemente es empleada en la elaboración de estos productos es la taurina (ácido 2-amino-etano-sulfónico) que es un aminoácido existente en el cuerpo humano y en los alimentos (principalmente en la proteína animal).

Aunque este aminoácido parece participar en varios procesos importantes, aún resta dilucidar y caracterizar algunas de sus funciones.

Respecto de su toxicidad, no se han reportado efectos negativos asociados al consumo de esta. Desafortunadamente no se han elaborado estudios integrales que incluyan su probable toxicidad en exposiciones crónicas. En este estudio se evaluaron algunos parámetros que pueden auxiliarnos para conocer en qué concentraciones la taurina podría provocar un efecto tóxico.

El Índice de Supervivencia (IS), como una medida del efecto global de la exposición a genotóxicos es una herramienta útil, especialmente cuando se utiliza tomando como referencia el efecto en organismos que no contienen en su genotipo ni mutaciones morfológicas o asociadas con alguna deficiencia, ni arreglos en los cromosomas que pudieran modificar la posibilidad de supervivencia de los organismos.

Las diferentes concentraciones de taurina no afectaron de forma significativa la sobrevivencia de las moscas tratadas, ya sea administrada sola o en combinación con la NDMA.

En las moscas, la presencia de inversiones múltiples como las del cromosoma balanceador afectó la sobrevivencia de las moscas, esto hace suponer que las inversiones podrían estar alterando la actividad metabólica de las moscas tratadas. En el cromosoma 3 de la mosca, se ubican genes relevantes para el metabolismo como CYP 18 (Schenkman *et al.*, 2003). Es recomendable explorar el efecto de tratamientos similares en la actividad metabólica de *Drosophila*.

Por otro lado, en algunas concentraciones se recobraron más moscas que en las series testigo. En todos los organismos, un hecho generalizado es que de aquellos que inician el desarrollo, hay una fracción característica que no alcanza la edad reproductiva, la pérdida de estos organismos puede ocurrir en cualquier momento a partir de la fecundación y hasta poco antes de la madurez sexual. En el caso de *Drosophila melanogaster* se ha determinado que alrededor del 40% de los huevos que pone una hembra no tratada no termina su desarrollo y por lo tanto mueren- como huevos, larva o pupa- sin llegar al estadio adulto. Sin embargo, si a lo largo del desarrollo, los organismos son sometidos a cierto nivel de estrés se ha encontrado que el número de moscas que completan el desarrollo aumenta (García y Ramos, 2004).

El estrés provocado por el tratamiento con agentes genotóxicos podría provocar la activación de estos mecanismos, o bien, otros procesos celulares y sistémicos que permitan un resultado equivalente, lo cual explicaría porqué se observan IS mayores en las series tratadas que en la testigo.

Es importante recalcar que muchas cascadas de desintoxicación son activadas y conforme se agotan los recursos de los organismos se van induciendo otros que les permiten sobrevivir.

La taurina ha sido estudiada en diversos organismos sin encontrar evidencias de su actividad mutagénica. En este trabajo se muestra que la taurina muestra actividad mutagénica sólo a bajas concentraciones. La falta de actividad a concentraciones altas podría explicarse a partir de la inducción de mecanismos de desintoxicación que bloqueen el efecto de la taurina. Cuando las concentraciones son sumamente bajas, el estímulo podría no ser suficiente para activar estas rutas, por lo cual el compuesto podría alcanzar la célula blanco y ocasionar daño que se manifiesta como manchas en las alas de las moscas tratadas. La taurina no mostró actividad protectora del daño inducido, aunque se apreció que en las moscas pretratadas con el promutágeno NDMA el incremento en la concentración de taurina se asoció con una frecuencia menor de mutación. Sin embargo, es posible que la respuesta esté asociada con la pérdida de células afectadas (muerte celular), más que con un efecto protector. Esto concuerda con la toxicidad observada en las altas concentraciones de taurina que reportó baja sobrevivencia.

En la evaluación de la actividad reproductiva, se encontró que la taurina modifica negativamente la cantidad de progenie proveniente de machos tratados, sin embargo, es necesario continuar el estudio de este efecto utilizando otras concentraciones que permitan definir mejor la respuesta. Se sugiere la implementación de variantes del protocolo de investigación empleado, en cuanto a tiempos, concentraciones y repeticiones de tal manera que se puedan obtener un mayor número de datos que evidencien los posibles efectos genotóxicos de la taurina y discernir mejor su mecanismo de metabolización en el modelo biológico *Drosophila melanogaster*.

VI. CONCLUSIONES

- La taurina no es inocua.
- La taurina modificó el índice de sobrevivencia para moscas silvestres solo a 50 mM.
- La presencia del cromosoma balanceador interfirió con la respuesta de genotoxicidad de las moscas tratadas con taurina.
- La taurina sólo mostró actividad genotóxica a bajas concentraciones.

VII. BIBLIOGRAFÍA

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

Amaral V. S., Silva R. M., Reguly M. L. Andrade H. (2006) *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. Mutat Res 583, 67-74.

Baker D. H. (2006) Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids J. Nutr. 136: 1670S–1675S.

Becker H. J. (1976) Mitotic recombination. En: The genetic and biology of *Drosophila*. (Ashburner y Novitski, eds.) Academic Press. Nueva York.

Botas J. (2007) *Drosophila* researchers focus on human disease. Nature genetics. 39 (5): 589-591

Brusick, D. (1987) Evolution of testing strategies for genetic toxicity. Mutation Res. 205: 69-78.

Cañas D. P. (2002) Biological and nutritional role of taurine and its derivatives. Rev. Chil. Nutr; 29(3): 1-12

Delgado R. A. (1990) Daño genético inducido por mutágenos positivos en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 75 pp.

Eaton D. y Klaassen C., 2005. Principios de toxicología en Principios de toxicología Casaratt L. J., y Doull J. Macmillan Publishing.

Engel J., Muhling J., Weiss S., Karcher B., Lohr T., Menges T., Little S. y Hempelmann G. (2005) Relationship of taurine and other amino acids in plasma and in neutrophils of septic trauma patients. Amino Acids 30 (1) : 87-94

EMS (Environmental Mutagen Society (1976) Environmental mutagen hazards. Science. 187: 503-514.

Frei H, Würzler FE. (1988) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. Mutat Res. Apr; 334 (2) : 247-58.

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

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

García N. R. y Ramos M. P. (2004) Obtención de la curva de viabilidad huevo-adulto en tres cepas de *Drosophila melanogaster*. Congreso Nacional: Sociedad Mexicana de Genética. Ixtapa de la Sal.

Glass E. N. y Czarnecki- Maulden G. L. (1990) Taurine concentration in different food products. FASEB J. 4:780-799.

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

Graf U., Würzler F. E., Katz A. J., Frei H. J. Juon H., Hall C. y Kale P. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, Environ. Mutagen. 6: 153-158.

Gregus y Klaassen (2005) Biotransformación En: Principios de toxicología (Casaratt L. J., y Doull J. ed.) Macmillan Publishing. Nueva York Co.

Hayes A., 2001 (ed) Principles and Methods of Toxicology, 4th ed. New York. Taylor and Francis.

Hong, J. and Yang, C. S. (1985) The nature of microsomal N-nitrosodimethylamine demethylase and its role in carcinogen activation. *Carcinogenesis*, London press.

Honsen S. (2001) The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diab Metab Rev.* 17: 330-346.

Huxtable, R. I. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72: 101–163.

Index Merck (1989) Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals. Publish by Merck and Co., Inc. Rahway. N. USA. 1606p

Jacobsen, J. G. y Smith L. M. (1968) Biochemistry and physiology of taurine derivatives. *Physiol Rev*; 48: 424-511.

Katz A. J. (1985) Sodium thiosulfate inhibits cisplatin-induced mutagenesis in somatic tissue of *Drosophila*. *Environ. Molec. Mutag.* 13: 97-99.

Kaya B., Yanikoglu A. y Marcos R. (2000) Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D y 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratog., Carcinog. Mutagen.* 19: 305-312.

Klaassen y Watkins, (2005) Absortion, distribution and excretion of toxicans. En: Toxicology, the basic science of poison. (Casaratt L. J., y Doull J. eds.) Macmillan Publishing. Nueva York.

Lambert I. H. (2004) Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem Res*;29:27–63.

Loureco R. y Camilo M. (2002) Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutr. Hosp.* 6:262-270.

Lindsley D. L. y Zimm G. (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press. Inc. USA 1133pp.

McCarty M. F. (2004) Sub-optimal taurine status may promote platelet hyperaggregability in vegetarians. *Med Hypotheses*;63: 426–33.

Muñoz H. A. (1997) Comparación del potencial aneuploidogeno de compuestos citostaticos en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestria. Facultad de Ciencias. UNAM

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 somaticas de *D. melanogaster*. Tesis de maestria. Facultad de Ciencias. UNAM 151pp.

Ordaz T. M. G. (1998) Caracterización de la actividad genotóxica del aminoácido azufrado taurina y algunos antagonistas mediante el empleo de células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. UNAM 128pp.

Parkinson A. (2005) Biotransformación de los Xenobioticos en Principios de toxicología Casaratt L. J., y Doull J. Macmillan Publishing.

Preston y Hoffmann, 2005 en Principios de toxicología Casaratt L. J., y Doull J. Macmillan Publishing.

Ramos P., Abundis H., Gaytan J. C., Ordaz M. G. Orozco P. G., Maldonado J., Hernández J., González E., Reyes P., Galicia E. M. y Muñoz J. A. (1993) Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill. México. 131p.

Russell, P. J. (1998) Genetics. Harper Collins Publishers. Third Edition. 758pp

Scanlan, R. A. (1983) Formation and occurrence of nitrosamines in food. *Cancer Res.*, 43: 2435S-2440S.

Schenkman J. B., Choudhary, Dharamainder, Jansson, Ingela, Sarfarazi, Mansoor, Stoilov, Ivaylo (2003). Involvement of Cytochromes P450 in Development. *Proc. Indian Natn Sci Acad.* B69. 6:929-941.

Silencio B. J. L. y Montaña B. S. (2004) Taurina. *Nutrición Clínica.* 7(3):195-205.

Stapleton P., Charles R., Redmond H. y Bouchier-Hayes D. (1997) Taurine and human nutrition. *Clin. Nutr.* 16:103-108.

Sturman J., Hepner G., Hofmann A. y Thomas P. (1975) Metabolism of [35S] taurine in man. *J. Nutr.* 105:1206- 1214.

Van der Hulst RR, von Meyenfeldt MF, Deutz NE, Soeters PB. (1997) Glutamine extraction by the gut is reduced in depleted [corrected] patients with gastrointestinal cancer. *Ann Surg*;225:112-21

Vogel E. y Natarajan A. (1979) 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. (1992) Genotoxic chemical an introduction into the basic principles of genetic toxicology. *Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese, RU Leiden, Sylvius Laboratoria.* (curso).

Williams, G. (1989) Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA repair test for 300 chemicals; *Mut. Res.* 221:263-286.

Wright C.E., Lin, T.T., Syurman, J.A., Gaull, G.E. (1985) Taurine scavenges oxidized chlorine in biological systems.

Wright, C.E., Tallan, H.H., Lin, Y.Y., Gaull, G.E., (1986) Taurine: biological update. *Ann. Rev. Biochem.* 55. 427–453

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