

Alvis, Rafael; Pino, José; González, José; Francia, Juan C.; Shiga, Betty
Efecto citoprotector del camu-camu Myrciaria dubia en tres líneas celulares de ratón expuestos in vivo
a bromato de potasio

Revista Peruana de Biología, vol. 17, núm. 3, diciembre, 2010, pp. 389-392
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195019027017>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

NOTA CIENTÍFICA

Efecto citoprotector del camu-camu *Myrciaria dubia* en tres líneas celulares de ratón expuestos in vivo a bromato de potasio

Citoprotective effect of camu-camu *Myrciaria dubia* on three cellular lines of mouse exposed in vivo to potassium bromate

Alvis Rafael*, Pino José, González José, Francia Juan C., y Betty Shiga

* Autor para correspondencias:

Laboratorio de Reproducción y Biología de Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Casilla 11-058, Lima 11, Perú. Tel.: +51 6 197000 - 1529; fax: +51 6 197000 - 1509.

E-mail Alvis Rafael: ralvisd@gmail.com

Resumen

Se evaluó *in vivo* la capacidad citoprotectora del fruto de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh Camu-camu frente al daño mutagénico producido por bromato de potasio (68,5 mg/k) sobre tres líneas celulares de ratón (hígado, riñón y células sanguíneas). Se utilizó ratones (n= 120) divididos en tres grupos los cuales bebieron *ad libitum*: TI= control negativo (solo agua) y el grupo TIII (control positivo); El grupo TII bebió el extracto acuoso (2% p/v) del fruto de camu-camu. A los diez días se inyectó una dosis única de KBrO₃ (68,5 mg/kg peso corporal) vía intraperitoneal, a los grupos TII y TIII. El tratamiento con camu-camu continuó 35 días más, luego los ratones fueron eutanizados para determinar la frecuencia del daño al DNA mediante el protocolo del ensayo cometa alcalino. El grupo TII mostró en todas las líneas celulares el efecto citoprotector del camu-camu (p< 0,05). El efecto dañino al DNA por la acción oxidativa del KBrO₃ es inhibido por el extracto acuoso del fruto de camu-camu, probablemente por la presencia de los agentes antioxidantes como el Ácido ascórbico y los flavonoides.

Palabras clave: Camu-camu, *Myrciaria dubia*, Bromato de potasio, genotoxicidad, ensayo cometa.

Abstract

It was evaluated *in vivo* the cytoprotective capacity of the fruit of *Myrciaria dubia* H.B.K. MC VAUGH "Camu-camu (Myrtaceae) against mutagenic damage caused by potassium bromate (68.5 mg/k) on three mouse cell lines (liver, kidney and blood cells). Mice (n = 120) were divided into three groups which drank *ad libitum*: distilled water; TI (negative control) and TIII (positive control), the TII group (positive control) drank the aqueous extract (2 %) of the fruit of Camu-camu. After ten days, only the TII and TIII groups were intraperitoneally injected with a single dose of KBrO3(68.5 mg/k). The camu-camu treatment lasted 35 days more, where they were euthanized to determine the frequency of DNA damage by means of the alkaline comet assay protocol. It was observed in all cell lines a cytoprotective effect of camu-camu (p<0.05) with respect with the negative control. The DNA-damaging effects of oxidative KBrO₃ action is inhibited by the 2% aqueous extract of camu-camu fruit, probably by the presence of antioxidants such as ascorbic acid and flavonoids.

Keywords: Camu-camu, *Myrciaria dubia*, Potassium bromate, genotoxicity, alkaline comet assay.

Introducción

El Bromato de potasio (KBrO₃) es una sustancia ampliamente utilizada para mejorar la calidad de la harina en la industria panificadora. Este aditivo aumenta y mejora la consistencia de la masa, además actúa como agente blanqueador favoreciendo la presentación del producto y reduciendo el costo del consumo de energía en la cocción (Ribotta et al. 1999). Durante la cocción, el KBrO₃ se reduce en un compuesto llamado Bromuro de Potasio (BRK) (Cunningham & Anderson 1956); esta reducción es a veces incompleta y el producto residual del KBrO₃ permanece en el gluten, por lo que es una fuente potencial de daño oxidativo al ingerirla (Kasai et al. 1987). Desde 1992, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y Alimentación (FAO) consideran al KBrO₃ como sustancia nociva para los humanos, debido a que su ingestión prolongada puede causar vómitos, diarreas, metahemoglobinemia y daños renales (Watanabe et al. 2004); además, tiene efectos mutagénicos, destruye la vitamina B₁, inhibe la disponibilidad del hierro y degrada el ácido fólico (Budavari et al. 1989). Las propiedades citotóxicas, mutagénicas y genotóxicas del KBrO₃ radican en su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies óxido de nitrógeno (NOS), que producen entre otras alteraciones la peroxidación lipídica y oxidación del DNA (Nakae et al. 2002); reportándose daños al riñón (mesoteliomas) (Kaya & Topaktaş 2007).

micronucleadas (Hayashi et al. 1988, Poul et al. 2004). Ha sido reportado que una simple administración de KBrO₃ tiene el potencial para activar al 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG), un marcador representativo del daño oxidativo al DNA en riñones en ratas machos. El 8-OH-dG es el promotor más importante de mutaciones y el inductor inicial de tumores provocado por el KBrO₃ (Khan et al. 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, algunos países han prohibido el uso de bromato de potasio en la producción de pan. Sin embargo, el uso de KBrO₃ todavía se da en la panificación artesanal (Kaya & Topaktaş 2007).

El camu-camu, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh es una especie frutal amazónica perteneciente a la familia de las Myrtáceas. Posee un alto contenido de ácido ascórbico (AsA) (entre 2780-4000 mg/100 g de pulpa) según investigaciones realizadas en Brasil (Justi 2000) y Perú (Ascuña et al. 1997). El AsA es un potente antioxidante soluble en agua el cual elimina de manera eficaz los radicales libres (Frei 1989). Además se ha reportado la presencia de flavonoides en este fruto, los cuales optimizan la acción del AsA (Ramberg 2003). Diversos estudios vienen demostrando las propiedades antimutagénicas (Ghaskadbi & Vaidya 1989, Khan & Sinha 1993, Kojima et al. 1992), antigenotóxicas (Hoda & Sinha 1993); anticlastogénicas (Vijayalaxmi & Venu 1999) del ácido ascórbico debido a su capacidad antioxidativa frente a la acción de los radicales libres (Chatterjee et al. 1995, Klay & Sis 1993).

El uso del ensayo cometa se ha incrementado en los últimos años para evaluar daño oxidativo al DNA provocado por compuestos genotóxicos (Poul et al. 2004, Olive & Banáth 2006). La popularidad de esta prueba se basa en su sensibilidad, relativo bajo costo y simplicidad (García et al. 2007). La manera más común para visualizar el efecto cometa es utilizando colorantes fluorescentes como DAPI, bromuro de Etidio, naranja de acridina, etc.; estos colorantes no necesitan un tratamiento especial, aunque el uso de un microscopio de fluorescencia es podría ser un limitante; sin embargo los colorantes a base de plata ofrecen la posibilidad de colorear los cometas (daño al DNA) y visualizarlo a través de un microscopio convencional.

El presente estudio se prueba el extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* como un posible citoprotector del daño oxidativo producido por $KBrO_3$ sobre el DNA de células polimorfonucleares de sangre venosa y de dos tipos celulares procedentes de hígado y riñón.

Material y métodos

Bromato de Potasio ($KBrO_3$) (CAS: 7758-01-2), metanol absoluto (Carlo Erba); Suero Albúmina de Bovino (BSA), Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,2, y Giemsa (Sigma).

Se utilizaron 10 ratones machos Swiss albino Rockefeller de 6 a 8 semanas de edad, para cada tratamiento mantenidos bajo condiciones de bioriego de 14 horas Luz y 10 horas oscuridad, alimentados con alimento balanceado para animales (Purina, Perú), y agua *ad libitum*.

Frutos y muestras botánicas de camu-camu, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh fueron colectados en la ciudad de Pucallpa (Perú), para su posterior identificación con claves y tratamiento en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo (UNMSM); la pulpa de los frutos de camu-camu fueron extraídos y secados a 60 °C por 24 horas. Luego se preparó un extracto acuoso al 10% (p/v) por 24 horas a 60 °C. Después de las 24 horas el extracto es decantado, filtrado, cuantificado y guardado a -20 °C, con este extracto se preparó otro extracto acuoso final al 2% (p/v).

Tratamiento.- Se establecieron 3 tratamientos: TI= Control Negativo, TII= camu-camu + $KBrO_3$ (68,5 mg/kg) y TIII= Control Positivo ($KBrO_3$; 68,5 mg/kg). Los tratamientos fueron aplicados por un periodo de 35 días. Para el TI, se administro agua *ad libitum*. En el TII se utilizó el extracto acuoso (50 mg/k) de camu-camu, administrado *ad libitum* durante 10 días. A partir del décimo día de tratamiento se inyectó intraperitonealmente (i.p.) $KBrO_3$. Simultáneamente se continuó administrando el extracto acuoso de camu-camu. Se tomaron datos de peso inicial y peso final.

Evaluación.- Para cada tratamiento los ratones fueron eutánizados por dislocación cervical. Se registró el peso del hígado y del riñón de cada ratón.

Ensayo cometa.- Se utilizó el protocolo de Singh et al. (1988) modificado por Tice et al. (2000) para tejidos animales.

Las células del tejido sanguíneo fueron homogenizados en una solución salina suplementada con Na_2EDTA ; de inmediato se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión a 37 °C, luego se vertió la agarosa sobre un portaobjetos previamente recubierto con agarosa de punto de fusión normal, después de solidificarse

de fusión. Las láminas fueron incubadas en solución de lisis 2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Trizma, HCl, pH 12,1, Triton X-100 a 4 °C por 1 hora en una cubeta de electroforesis horizontal. La corrida se efectuó en el buffer 0,3 M NaOH 1 mM EDTA a 0,7 V/cm durante 30 minutos a 4 °C.

Para la evaluación de células de riñón e hígado, porciones de 0,01 g de tejidos procedentes de hígado y riñón fueron homogenizadas en una solución de NaCl y Na_2EDTA , obteniéndose un precipitado. Previamente se vertió la agarosa sobre un portaobjetos previamente recubierto con agarosa de punto de fusión normal. Todos los tejidos animales fueron mezclados con agarosa de bajo punto de fusión a 37 °C; incubándose las láminas en solución de lisis 2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Trizma, HCl, pH 12,1 y Triton X-100 a 4 °C por 1 h. La corrida se realizó en una cubeta de electroforesis horizontal durante 30 minutos a 4 °C conteniendo buffer 0,3 M NaOH y 1 mM EDTA. Todo el proceso se realizó con luz amortiguada.

La tinción fue realizada con una solución de nitrato de plata y se observó bajo un microscopio de campo claro. El grado de daño al DNA siguió el patrón de clasificación descrito por Sotil et al. (2007), el cual compara la cantidad observada en el núcleo denominado "cabeza" con la extensión de DNA llamado "cola"; se pueden considerar 5 niveles: Grado 0 o células no dañadas, sin cola; grado 1 o células ligeramente dañadas, con cola menor al tamaño de la cabeza, grado 2 o células dañadas, con cola igual al tamaño de la cabeza, grado 3 o células fuertemente dañadas, con cola mayor al tamaño de la cabeza, y grado 4 o células en apoptosis.

Estadística.- Los resultados obtenidos para todos los tratamientos fueron analizados por test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si los resultados tenían una distribución normal (datos paramétricos). Una vez corroborados estos resultados se aplico la Prueba Paramétrica de Tukey para la comparacion de medias con diferencia significativa $p<0,05$; entre TI y cada grupo de tratamiento.

Resultados

Según el patrón de clasificación para determinar el daño en el DNA no se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre TI y TII para las tres líneas celulares en estudio. Al comparar TI y TII con TIII respectivamente, se evidenció diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto al daño inducido por $KBrO_3$ (Tabla 1).

Discusión

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado el efecto citotóxico, genotóxico y carcinogénico del $KBrO_3$ en roedores (Perry & Evans 1975, Carrano & Johnston 1977, Carrano et al. 1978). Los resultados obtenidos en este estudio confirman el efecto genotóxico de $KBrO_3$ *in vivo* para tres líneas celulares de ratón (sangre, hígado y riñón).

El hecho de no encontrar efecto sobre el peso corporal (dato no publicado); ni alteración clínica o en el comportamiento del animal, sugiere que los tratamientos no inducen a una toxicidad sistémica en la dosis propuesta.

No se conoce el mecanismo específico por el cual el bromato de potasio induce los tumores. Se ha sugerido que el bromato de potasio produce su respuesta tóxica a través de un daño oxidativo como resultado del incremento de los niveles de

Tabla 1. Porcentajes promedio de células sanguíneas observadas (en parentesis intervalo de confianza) según los grado de daño al DNA (Sotil et al. 2007) en la determinación de la capacidad citoprotectora del fruto de *Myrciaria dubia*, Camu-camu, frente al daño mutagénico producido por bromato de potasio sobre células de hígado, riñón y sangre de ratón.

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Sangre					
Control Negativo	93,60 ± 1,32	3,40 ± 1,28	0,80 ± 0,37	1,20 ± 0,48	0,60 ± 0,24
Tratamiento	88,00 ± 2,46*	5,80 ± 0,86 *	3,40 ± 1,43*	1,80 ± 0,58	1,00 ± 0,54
Control positivo	80,80 ± 3,00	9,00 ± 0,94	5,00 ± 0,70	3,00 ± 0,70	2,00 ± 0,77
Riñón					
Control Negativo	96,40 ± 0,81	1,60 ± 0,24	0,60 ± 0,24	0,80 ± 0,97	0,80 ± 0,37
Tratamiento	85,00 ± 2,56*	9,00 ± 2,02*	2,60 ± 0,40*	1,60 ± 0,40	1,60 ± 0,24
Control positivo	86,00 ± 2,02	6,80 ± 1,01	3,40 ± 0,74	1,60 ± 0,50	3,00 ± 1,04
Hígado					
Control Negativo	94,00 ± 0,54	3,20 ± 0,58	1,60 ± 2,44	0,80 ± 0,20	0,50 ± 0,28
Tratamiento	75,60 ± 2,50*	12,80 ± 1,39*	5,60 ± 1,02	2,00 ± 0,63	1,20 ± 0,48
Control positivo	68,80 ± 2,65	14,00 ± 1,22	8,40 ± 1,02	4,40 ± 0,81	4,40 ± 1,24

* Prueba de Tukey. Diferencia significativa p <0,05 comparando el tratamiento y los controles.

consecuencia de la peroxidación lipídica y generación de radicales de oxígeno (ROS) que inducen el daño al DNA (Wolf et al. 1998) cambiando la expresión génica por alteraciones en uno u varios factores de transcripción o mecanismos de transducción de señales (Suzuki et al. 1997).

El efecto protector de las sustancias antioxidantes contra la genotoxicidad puede realizarse de tres maneras (O'Donoghue et al. 1999): (1) disminuyendo la asimilación de genotoxígenos prooxidantes, (2) previniendo su formación en la dieta misma; como agente reductor en los lugares de acción de los prooxidantes y (3) induciendo enzimas de detoxificación capaces de reducir a los intermedios activos de oxígeno.

Al analizar el efecto protector del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* mediante el ensayo cometa se evidenció que no existen diferencias significativas entre TII y TI; este resultado sugiere un efecto protector del extracto acuoso del fruto del camu-camu frente al daño oxidativo de $KBrO_3$. Levine et al. (2001) encontró que el suplemento oral con vitamina C en humanos disminuye el daño al DNA inducido por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estudios in vivo en células humanas e in vivo en roedores (Sai et al. 1992) demostraron que altas concentraciones intracelulares de ácido ascórbico reducen las mutaciones causadas por el estrés oxidativo del $KBrO_3$; es probable que el alto contenido de AsA o vitamina C presente en el fruto de camu-camu, sea la responsable del efecto protector evidenciado en los resultados al encontrarse un número similar de células de grado 0 entre TII y TI.

Según Fenech et al. (1999, citado por Poul et al. 2004) el bromato de potasio induce alteraciones permanentes a partir de diferentes tipos de daños que pueden ser detectados en un test de micronúcleo mediante el bloqueo de citocinesis. Estos hallazgos indicarían que el bromato de potasio induce a un daño del DNA por una serie de diferentes mecanismos además del estrés oxidativo.

Agradecimiento

Al Consejo Superior de Investigación del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por la ayuda económica.

Literatura citada

- Ascuña Y.M., Lira J. y P.C. Mourão. 1997. Proyecto de pre-factibilidad para la producción de pulpa de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaugh) en Pucallpa. [TESIS], UNAM.
- Budavari S., O'Neil M., Smith A. and P.E. Heckelman. 1989. The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, drugs and Biologicals. 11th ed. Rahway, NJ: Merck and Company, Inc.
- Carrano A.V. & G.R. Johnston. 1977. The distribution of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac, *Chromosoma* 64: 97–107.
- Carrano A.V., Thompson L.H., Lindi P.A. and J.L. Minkler. 1978. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis, *Nature* 271: 551–553.
- Chatterjee I.B., Mukhopadhyay C.K. and M.K. Ghosh. 1995. Vitamin C: a potential savior against free radical induced oxidative damage. *Current Science*; 69 (9): 747 – 751.
- Cunningham D. and J. Anderson. 1956. Decomposition of bromate in fermenting and nonfermenting doughs, *Cereal Chem.* 33: 290–299.
- Frei B. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *PNAS USA*; 86: 6377- 381.
- García O., Romero I., González J. and T. Mandina. 2007. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutation Research* 627: 186–190.
- Ghaskadbi S. & V. Vaidya. 1989. In vivo antimutagenic effect of ascorbic acid against the mutagenicity of the common antiamoebic drug diiodohydroxyquinoline. *Mutation Res.* 222: 219 – 222.
- Hayashi M., Kishi M., Sofuni T., and M. Ishidate Jr. 1988. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chemical Toxicology* 26:487–500.
- Hoda Q. and S.P. Sinha. 1993. Vitamin – C mediated minimisation of rogor induced genotoxicity. *Mutation Res.*; 229: 29 - 36.
- Justi K. 2000. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Arch. Latinoam. Nutr.* Dec.; 50(4): 405-8.
- Kasai H., Nishimura S., Kurokawa Y. and Y. Hayashi. 1987. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis* 8: 1959–1961.
- Kaya F. & M. Topaktaş. 2007. Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro. *Mutation Res.* 626: 49–55.

- Khan N., Sharma S. & S. Sultana. 2003. *Nigella sativa* (black cumin) ameliorates potassium bromate-induced early events of carcinogenesis: diminution of oxidative stress. *Human & Experimental Toxicology* 22:193-203.
- Khan P. & S. Sinha. 1993. Antimutagenic efficacy of higher doses of vitamin – C. *Mutation Res.*; 298: 157 – 161.
- Kojima H, Konishi H, Kuroda Y. 1992. Effects of L- ascorbic acid on the mutagenicity of ethlymethane sulfonate in cultured mammalian cells. *Mutation Res.*; 266: 85 – 91.
- Levine M., Wang Y., Padayatty S.J., and J. Morrow. 2001. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women Proc. National Academic Science U.S.A. 98: 9842–9846.
- Nakae D., Umemura T. and Y. Kurokawa. (2002). Reactive oxygen and nitrogen oxide species-induced stress, a mayor intrinsic factor involved in carcinogenic processes and a possible target for cancer prevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 3:313-318.
- O'Donoghue J., Barber E.D., Hill T., Aebi J. and L. Fiorica. 1999. Hydroquinone: Genotoxicity and Prevention of Genotoxicity Following Ingestion. *Food and Chemical Toxicology* 37: 931-936.
- Olive P. and J. Banáth. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1(1):23–29.
- Perry P. & H. Evans. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, *Nature* 258: 121–125.
- Poul J., Huet S., Godard T and P. Sanders. 2004. Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test. Comparison to potassium bromate. *Food and Chemical Toxicology* 42: 203–209
- Ramberg J. 2003. Why are Whole-Food Dietary Supplements Better than Single-Nutrient Supplements? A Review Based in the Vitamin C Literature. *GlycoScience & Nutrition*; Jul Vol. 4, No. 4 : 1-8.
- Ribotta, P., Morcillo M. y A. León. 1999. Efecto de distintos oxidantes sobre la calidad de panes elaborados por el método tradicional argentino. *Agriscientia*, Vol. XVI: 3-10.
- Sai K., Umemura T., Takagi A., Hasegawa R. and Y.Kurokawa. 1992. The protective role of glutathione, cysteine and vitamin C against oxidative DNA damage induced in rat kidney by potassium bromate. *Japan. J. Cancer Res.*, 83, 45–51.
- Singh N.P., Mccoy M.T., Tice R.R. and E.L. Scheider. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 237: 123-130.
- Sotil G., Alvis R., Francia J. y B. Shiga. 2007. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev. Perú. Biol.* Número especial 13(3): 249-253.
- Suzuki Y.J., Forman H.J. and A. Sevanian. 1997. *Oxidants as Stimulators of Signal Transduction. Free Radical Biology & Medicine* 22, 269-285.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. and Y.F. Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206–221.
- Vijayalakshmi K.K, and R. Venu. 1999. In vivo anticlastogenic effects of L – ascorbic acid in mice. *Mutation Res.*; 438: 47 – 51.
- Watanabe S., Tajima Y., Yamaguchi T and T. Fukui. (2004). Potassium Bromate-induced hyperuricemia stimulates acute kidney damage and Oxidative Stress. *Journal of Health Science*, 50(6): 647–653.
- Wolf D., Crosby L., George M. et al. 1998. Time and dose-dependent development of Potassium bromate – Induced tumors in male Fischer 344 Rats. *Toxicologic Pathology* 26(6):724-729.