



Acta Universitaria

ISSN: 0188-6266

actauniversitaria@ugto.mx

Universidad de Guanajuato

México

Muñoz-Hernández, Manuel de Jesús; Burciaga-Nava, Jorge Alberto; Cuevas-González, Juan Carlos; Zambrano-Galván, Graciela
Correlación de polimorfismos del gen COL1A2 con fluorosis dental en niños mexicanos
Acta Universitaria, vol. 27, núm. 1, enero-febrero, 2017, pp. 83-87
Universidad de Guanajuato
Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41650152009>

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

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Correlación de polimorfismos del gen *COL1A2* con fluorosis dental en niños mexicanos

Correlation of *COL1A2* gene polymorphisms with dental fluorosis in mexican children

Manuel de Jesús Muñoz-Hernández*, Jorge Alberto Burciaga-Nava**, Juan Carlos Cuevas-González***, Graciela Zambrano-Galván*^o

RESUMEN

La fluorosis dental (FD) es la hipomineralización del esmalte dental causada por el aumento de la porosidad, cuya severidad se debe a una ingesta excesiva de flúor (F) con relación dosis-respuesta durante el desarrollo del esmalte. El objetivo del trabajo fue determinar la correlación de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *colágeno tipo 1 alfa 2 (COL1A2)* con FD en niños mexicanos de 10 a 12 años, utilizando el Índice de Dean para establecer el grado de FD y PCR-HRM para la genotipificación de los polimorfismos. Se incluyeron 100 niños de 10.9 ± 0.78 años; las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas fueron: G = 52.5%, A = 47.5%, G/G = 27.5%, G/A = 49.8%, A/A = 22.5%, C = 63.3%, T = 36.5%, C/C = 40.3%, C/T = 46.3%, T/T = 13.3% de los polimorfismos rs810687 y rs411717, respectivamente, con un coeficiente de correlación de Pearson $r = -0.017$ ($p > 0.05$) con FD. Los resultados mostraron que no existía correlación entre la FD y la presencia de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2*.

ABSTRACT

Dental fluorosis (FD, for its acronym in spanish) is the hypomineralization of dental enamel caused by increased porosity, severity is due to an excessive intake of fluoride with a dose-response relationship during enamel development. The objective of this study was to determine correlation of rs810687 and rs411717 polymorphisms of (*colageno tipo 1 alfa 2*) *COL1A2* gene with FD in Mexican children aged 10 to 12 years, using Dean Index to establish degree of FD and PCR-HRM for polymorphisms genotyping. We included 100 children of 10.9 ± 0.78 years; Allele and genotype frequencies found were: G = 52.5%, A = 47.5%, G/G = 27.5%, G/A = 49.8%, A/A = 22.5%, C = 63.3%, T = 36.5%, C/C = 40.3%, C/T = 46.3%, T/T = 13.3% of rs810687 and rs411717 polymorphisms respectively; with a Pearson correlation coefficient $r = -0.017$ ($p > 0.05$) with FD. Results showed that there was no correlation between FD and presence of rs810687 and rs411717 polymorphisms of the *COL1A2* gene.

INTRODUCCIÓN

El flúor (F) ingerido como contaminante del agua en altas concentraciones a lo largo del periodo de desarrollo del diente provoca un defecto en la estructura y mineralización de su superficie del esmalte, desarrollando un aspecto poroso, el cual inicia con una alteración en el metabolismo del ameloblasto, creando este una matriz defectuosa que se manifiesta clínicamente como una hipoplasia o defecto del esmalte dental. La fluorosis dental (FD) es la hipomineralización del esmalte dental por aumento de la porosidad, se debe a una excesiva ingesta de F durante el desarrollo del esmalte antes de la erupción, la cual presenta una relación dosis-respuesta (Vitoria, 2011). Para que aparezca la FD en los dientes, las condiciones indispensables son: primero, un consumo excesivo de F por encima de 1.5 mg/L de forma prolongada; y segundo, que el consumo coincida con el periodo de formación de los dientes desde la gestación hasta los ocho años de edad (Gómez, Gómez & Delgado, 2002; Lyaruu *et al.*, 2014). Al respecto, un estudio realizado por Betancourt-Lineares, Irigoyen-Camacho, Mejía-González, Zepeda-Zepeda y Sánchez-Pérez (2013) mostraron que existe una amplia dispersión de esta

Recibido: 15 de abril de 2016
 Aceptado: 23 de noviembre de 2016

Palabras clave:

Polimorfismo; fluorosis dental; correlación; México.

Keywords:

Polymorphism; dental fluorosis; correlation; Mexico.

Cómo citar:

Muñoz-Hernández, M. J. Burciaga-Nava, J. A., Cuevas-González, J. C., & Zambrano-Galván, G. (2017). Correlación de polimorfismos del gen *COL1A2* con fluorosis dental en niños mexicanos. *Acta Universitaria*, 27(1), 83-87. doi: 10.15174/au.2017.1324

* Laboratorio de Estomatología Molecular, Facultad de Odontología, Universidad Juárez del Estado de Durango. Predio Canoas s/n, Col. Los Ángeles, Durango, Durango, México. C.P. 34070. Tel. y fax (618) 8121417. Correo electrónico: gzambrano@ujed.mx

** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango. Avenida Universidad s/n, Col Centro, Durango, Durango, México, C.P. 34000. Tel.: (618) 8121779.

*** Laboratorio de Patología Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Juárez del Estado de Durango. Universidad Juárez del Estado de Durango. Predio Canoas s/n, Col. Los Ángeles, Durango, Durango, México, C.P. 34070. Tel. y fax: (618) 8121417.

^o Autor de correspondencia.

afección en México, siendo el estado de Durango uno de los más afectados. Por otra parte, se ha propuesto que la susceptibilidad individual a la exposición al F está relacionada con el componente genético, ya que este juega un papel crucial en la gravedad de la FD (Denbesten & Li, 2011; Vieira, Hanocock, Eggertsson, Everett & Grynps, 2005).

Se ha observado que durante el periodo de formación del diente el ameloblasto o célula formadora del esmalte produce una matriz proteica que luego se calcifica, y es lo que conocemos como esmalte. Un elemento crucial para la interacción con los cristales de hidroxiapatita en la formación de la matriz ósea y, por supuesto, la dental (Iracheta, 2001) es el colágeno. Desde el punto de vista genético, existen varios tipos de colágeno y el más considerable es el de tipo 1. Los fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, cementoblastos y odontoblastos elaboran fibras de colágena; las fibras no se forman en el interior de la célula, sino en la superficie o en el exterior de la misma. Estas fibras se fijan en la sustancia fundamental, y se convierten en parte fundamental de las matrices de los tejidos duros de los dientes (Dawson, 2010).

El colágeno es una proteína que está codificada por dos genes; *COL1A1* y *COL1A2* (*colágeno tipo I alfa 1* y *colágeno tipo 1 alfa 2*), los cuales dan origen a las dos fibras que fortalecen y dan soporte a los huesos. Esta proteína es la más abundante en el cuerpo humano (Huang *et al.*, 2008). Debido a su importante papel en la formación de hueso y la arquitectura ósea, los polimorfismos en *COL1A1* y *COL1A2* pueden influir en la aparición de FD. A la fecha, las mutaciones en el gen *COL1A2* en particular se han relacionado con un amplio espectro de enfermedades de hueso, cartilago y los vasos sanguíneos (Dagleish, 1997), no así en patologías de origen odontológico (Anguiano-Vega, 2013). Estos factores conducen a la formulación de hipótesis en la cual los polimorfismos genéticos en el gen *COL1A2* tienen un papel importante en la patogénesis de la fluorosis dental en población expuesta a altas concentraciones (Dawson, 2010), como lo es en el estado de Durango; sin embargo, existen resultados controversiales respecto a la relación de los polimorfismos del gen *COL1A2* y la FD en otras poblaciones (Escobar-García, Mejía-Saavedra, Jarquín-Yáñez, Molina-Frecherro & Pozos-Guillén, 2016).

El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2*, y su correlación con FD en niños mexicanos de 10 a 12 años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo y prospectivo de correlación clínico-molecular, donde se incluyeron 100 muestras de niños entre 10 a 12 años nacidos y crecidos en la ciudad de Durango, Durango, México. Este estudio contó con la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital General 450 del estado de Durango. La selección de la población participante se realizó a través de invitación directa al padre o tutor del niño en una reunión de información, donde se les explicó el motivo para la realización del estudio, así como los beneficios de conocer el estado de salud bucal de su hijo. Se incluyeron niños que fueran alumnos de escuelas primarias seleccionadas aleatoriamente cercanas a los pozos de agua con mayor concentración de F que abastecen a la ciudad; que ambos padres fueran originarios, nacidos y criados en la ciudad de Durango; que no presentaran restauraciones en sus dientes o tratamiento de ortodoncia y que hubieran vivido ininterrumpidamente en la ciudad de Durango. A los padres o tutores que aceptaron que su hijo participara, una vez firmada la carta de consentimiento informado, se les proporcionaron indicaciones precisas para la toma de muestra sanguínea, así como para realizar la exploración de cavidad bucal.

Procedimientos

Se diseñó un instrumento en forma impresa, el cual contenía preguntas relacionadas con la salud bucal, así como un odontograma. Con esto se permitió registrar la información obtenida de los padres de familia, al igual que la relacionada con el estado de salud bucal de los niños participantes.

Examen bucal

En el proceso de examen bucal se inspeccionaron las caras oclusal, vestibular, distal, lingual y mesial de todos los dientes temporales y permanentes presentes. Se colocó al niño con dirección a la luz del sol para permitir una visibilidad óptima de los cuadrantes. El grado de FD se determinó utilizando el Índice de Dean (Secretaría de Salud, 2003). Para complementar el estado de salud bucal general se incluyeron las siguientes mediciones: índice de dientes cariados-perdidos-obturados (IDCPO), índice de cuidados (IC) e índice de necesidades de tratamiento (INTC).

Tabla 1.
Condiciones de amplificación de los polimorfismos en estudio.

Fases	1ª Amplificación		2ª Amplificación	
	T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	10 min	94	10 min
Segunda desnaturalización	95	45 s	95	45 s
Alineación	54	45 s	60	45 s
Extensión	72°	45 s	72	45 s
Nº de ciclos	55		20	

T = temperatura; Nº = número.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2.
Datos del estado de salud bucal de la población en estudio.

Variable odontológica	Sí (%)	No (%)
Malposición dental	60	40
Autopercepción de fluorosis	47	53
Odontalgia previa	52	48
Autorreporte de obturaciones con amalgama	21	79
Órganos dentarios perdidos	30	70
Órganos dentarios obturados	9	91
Órganos dentarios cariados	64	36
Dentición mixta	54	46
Segundo molar permanente presente	94	6

Fuente: Elaboración propia.

Análisis de los polimorfismos rs411717(A>G) y rs810687(C>T) del gen COL1A2

Se obtuvo sangre capilar del dedo índice, la cual fue sometida a lisis alcalina, utilizando 100 µL de NaOH más 10 µL de sangre total, obteniendo una concentración final de 9.1% V/V; esta mezcla fue incubada a 37 °C por 15 min. El lisado obtenido se empleó para realizar la tipificación de los polimorfismos en estudio.

El análisis de los polimorfismos se realizó por dos fases de amplificación del sitio polimórfico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tres pasos, seguido por el análisis de fundido de los productos de amplificación como se describe a continuación: la primera amplificación por PCR convencional de punto final utilizando GoTaq Master Mix (Promega Inc. Madison, WI), con el objetivo de obtener cantidades semejantes de productos de amplificación de cada una de las muestras. La mezcla de reacción para muestras de 15 µL fue: GoTaq Master Mix 7.5 µL; agua 5.7 µL; iniciador sentido 0.3 µL; iniciador antisentido 0.3 µL; lisado sanguíneo 1.2 µL.

Para la segunda amplificación se realizó utilizando PCR en tiempo real. La mezcla de reacción para cada muestra (15 µL) fue preparada de acuerdo con el manual de usuario que acompaña al reactivo Type it HRM (Qiagen Inc. Germantown, Maryland). Se utilizaron los siguientes iniciadores para ambas amplificaciones: 5'-GTAAGGTAGGTTTGACTGCAGAG-3' (sentido), 5'-CCGTAGGGTCTGTTCTCATA-3' (antisentido) para el polimorfismo rs411717(A > G) del gen COL1A2; mientras que el análisis para el polimorfismo rs810687(C > T) del gen COL1A2 se realizó utilizando los iniciadores 5'-GGAATATAAATGACAGCAAGCATACC-3' (sentido), 5'-GAACCAAAGTCTAGTATACCTCTAAGC-3' (antisentido) bajo las condiciones de amplificación, tal como se muestran en la tabla 1. Para el análisis de las curvas de fundido se utilizó un termociclador Eco Real Time PCR System (Illumina Inc. San Diego, California) con canal para HRM.

Como estándares se utilizaron muestras procesadas por reacción en cadena de la polimerasa de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción correspondientes para rs411717(A > G) y rs810687(C > T) del gen COL1A2, con un tamaño de amplicon de 105 pb y 132 pb, respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de FD y del estado de salud bucal se establecieron por medio de la distribución de frecuencias de estas variables. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio por conteo directo, con la finalidad de obtener la distribución de los polimorfismos, mientras que se realizó el análisis de *Hardy-Weinberg* a través de la prueba de χ^2 , para establecer que en la población en estudio no ha actuado la selección natural o algún otro factor que produzca una mutación en su composición genética. Se aplicó la prueba de correlación de *Pearson* con el propósito de determinar la relación entre la presencia de los polimorfismos y la presencia de FD. Se consideró un intervalo de confianza del 95% y un valor de $p < 0.05$ para estimar la significancia estadística. Toda la información fue procesada en el paquete estadístico Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc San Jose, CA).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que existe una prevalencia del 96% de fluorosis dental en la población en estudio, dividida en 71% como leve y el 25% de moderada a severa. La media de edad de los participantes fue de 10.9 ± 0.78 años; un IDCPO de 1.41, un IC del 6.3% y un INCT del 83.6%. Los datos del estado de salud bucal se muestran en la tabla 2.

Tabla 3.
Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2*.

GENOTIPO	FRECUENCIA (n=100)
Polimorfismo rs810687	
G	52.50%
A	47.50%
GG	27.50%
GA	49.80%
AA	22.50%
Polimorfismo rs411717	
C	63.30%
T	36.50%
CC	40.30%
CT	46.30%
TT	13.30%

Fuente: Elaboración propia.

Asimismo, se observó que el 49% de los participantes consumieron agua hervida durante los primeros meses de vida, mientras que el 62% consumía agua embotellada y el 61% consume agua del bebedero escolar, lo que los hace más susceptibles al consumo de agua contaminada con flúor.

El análisis de genotipificación muestra una alta frecuencia de los alelos mutados G (48%) y T (36%) de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2*, respectivamente (tabla 3). Asimismo, se encontró un coeficiente de correlación de *Pearson* igual a $r = -0.017$ ($p > 0.05$), lo cual es un indicativo de la correlación negativa y estadísticamente no significativa entre la presencia de fluorosis dental en niños de 10 a 12 años y la presencia de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2*.

DISCUSIÓN

La búsqueda e implementación de indicadores moleculares de los procesos normales o patogénicos en humanos se ha ido incrementando en los últimos años, siendo el área odontológica un campo de oportunidad para tratar de dilucidar los posibles mecanismos de acción de alteraciones que modifican del estado de salud de los individuos, debido al entorno físico, químico y biológico (Anguiano-Vega, 2013).

El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2*, y su correlación con fluorosis dental en niños duranguenses de 10 a 12 años.

La fluorosis dental ocurre como resultado de un exceso en la ingesta de fluoruros durante la formación dental; por tanto, esta se produce durante la infancia (Gómez *et al.*, 2002; Lyaruu *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Betancourt *et al.* (2013), en veintisiete estados de la república mexicana y en la Ciudad de México se mostraron algunos datos de prevalencia de esta enfermedad, encontrando que el estado de Morelos presentaba una prevalencia relativamente baja, sobre todo si se comparaba con los datos obtenidos en el estado de Durango (88.8%). En nuestro caso, la prevalencia encontrada en la ciudad de Durango fue más elevada (96%) que la presentada a nivel estatal y nacional, lo que lo convierte en un problema de salud pública importante. Con base en esta información, nuestro grupo de trabajo se ha planteado la necesidad de continuar con esta línea de investigación, con el objetivo de establecer un perfil genético molecular individualizado que permita la identificación de blancos moleculares en poblaciones de alto riesgo.

En estudios previos se ha reportado la posible interacción de factores genéticos en la patogénesis de la fluorosis dental (Vieira *et al.*, 2005), lo cual corrobora lo aportado por otros autores que asumen que esta puede ser la razón por la que las poblaciones que están expuestas a ingestas elevadas de flúor presenten un amplio rango de severidad de fluorosis dental (Denbesten & Li, 2011). Por ello, el estudio de la influencia de factores genéticos es de gran importancia. Se ha observado clínicamente en la consulta odontológica que la presencia de los grados de severidad de fluorosis varía entre integrantes de una misma familia, aun cuando estos se encuentran expuestos a condiciones ambientales y de desarrollo similares, por lo que una posible explicación es la variabilidad genética de cada individuo que puede jugar un papel importante en el desarrollo de esta patología.

En este trabajo, el análisis de genotipificación mostró una alta frecuencia de los alelos mutados G (48%) y T (36%) de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2*, respectivamente. En este contexto, los estudios realizados por el proyecto HapMap (International HapMap Consortium, 2003) se encuentran enfocados en el establecimiento de la distribución en la variabilidad genética de los individuos a nivel mundial, sin embargo, hasta el momento no se cuenta con la distribución de los polimorfismos rs810687 y rs411717 del gen *COL1A2* de manera específica, hallazgo importante que aporta nuestro trabajo de investigación. Aunque la prevalencia de fluorosis dental y la frecuencia de los polimorfismos de riesgo fue alta

en la población en estudio, no hubo correlación significativa ($r = 0.017$, $p > 0.05$). Escobar-García *et al.* (2016) mostraron que no existía una relación estadísticamente significativa entre la presencia de otra variante polimórfica del gen *COL1A2* y la severidad de FD (OR = 2.24; 95% CI = 0.55 – 9.02). Por otra parte, en un estudio realizado en dos distritos de la provincia de Henan en China se presentó la primera evidencia de una asociación entre diferentes variantes polimórficas en el gen *COL1A2* con FD en poblaciones expuestas a altas concentraciones de fluoruro. No obstante, al no ser concluyentes los datos, los autores resaltaban la necesidad de realizar más estudios para confirmar la asociación (Huang *et al.*, 2008).

Es relevante mencionar que aunque este trabajo se encuentra relacionado con una alteración odontológica, no es exclusivo de esta disciplina ya que los resultados de este estudio pueden ser de utilidad en otras áreas de interés que tengan como objetivo el estudio de patologías relacionadas del gen *COL1A2*. Ello brinda un gran aporte a la epidemiología genética al encontrar frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados; es importante resaltar que en la población mexicana hasta el momento es escasa la información disponible en la literatura relacionada con la variabilidad genética.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que a pesar de que se encontró una frecuencia considerable de alelos mutados de los polimorfismos estudiados, estos no presentaron una correlación estadísticamente significativa con la fluorosis dental; sin embargo, este estudio coadyuva en la transición y realización de investigación básica epidemiológica molecular con aplicación clínica.

REFERENCIAS

- Anguiano-Vega, G. (2013). Biomarcadores moleculares. La nueva herramienta en la biotecnología médica y ambiental. Ciencia y Tecnología del siglo XXI. *Entretexos*, 4, 51-59.
- Betancourt-Lineares, A., Irigoyen-Camacho, M. E., Mejía-González, A., Zepeda-Zepeda, M., & Sánchez-Pérez L. (2013). Dental fluorosis prevalence in Mexican localities of 27 states and the D.F.: six years after the publication of the Salt Fluoridation Mexican Official Regulation. *Revista de Investigación Clínica*, 65(3), 237-247.
- Dalgleish, R. (1997). The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Research*, 25(1), 181-187.
- Dawson, D. V. (2010). Preliminary evidence of an association between *COL1A2* polymorphism and dental fluorosis in a population with high fluoride exposure. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 10(2), 96-98. doi: 10.1016/j.jebdp.2010.02.007.
- Denbesten, P., & Li, W. (2011). Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monographs in Oral Science*, 22, 81-96. doi: 10.1159/00032702.
- Escobar-García, D., Mejía-Saavedra, J., Jarquín-Yáñez, L., Molina-Frechero, N., & Pozos-Guillén, A. (2016). *Collagenase 1A2 (COL1A2) gene A/C polymorphism in relation to severity of dental fluorosis. Community dentistry and oral epidemiology*, 44(2), 162-168.
- Gómez, S. G., Gómez, S. D., & Delgado, M. M. (2002). *Flúor y fluorosis dental. Pautas para el consumo de dentífricos y aguas de bebida en Canarias*. Santa Cruz de Tenerife España: Dirección General de Salud Pública del Servicio Canario de la Salud.
- Huang, H., Ba, Y., Cui, L., Cheng, X., Zhu, J., Zhang, Y., Yan, P., Zhu, C., Kilfoy, B., & Zhang, Y. (2008). *COL1A2* gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calcitropic hormone levels, and dental fluorosis. *Community Dent Oral Epidemiol*, 36(6), 517-522. doi: 10.1111/j.1600-0528.2007.00424.x
- International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426(6968), 789-796.
- Iracheta, M. L. A. (2001). *El colágeno, ¿un cemento biológico que mantiene la arquitectura y plasticidad tisular? Horizontes culturales: las fronteras de la ciencia 2000* (pp. 119-137). España: Espasa Calpe.
- Lyyaruu, D. M., Medina, J. F., Sarvide, S., Bervoets, T. J., Everts, V., Denbesten, P., Smith, C. E., & Bronckers, A.L. (2014). Barrier formation: potential molecular mechanism of enamel fluorosis. *Journal of Dental Research*, 93(1), 96-102. doi: 10.1177/0022034513510944
- Secretaría de Salud (2003). *Manual para el uso de fluoruros dentales en la República Mexicana*. México: Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, Subdirección de Salud Bucal.
- Vieira, A. P., Hanocock, R., Eggertsson, H., Everett, E. T., & Grynpsas, M. D. (2005). Tooth quality in dental fluorosis genetic and environmental factors. *Calcif Tissue Int*, 76(1), 17-25.
- Vitoria Miñana, I. (2011). Promoción de la salud bucodental. *Rev Pediatr Aten Primaria*, 13(51), 435-458.