

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

“Efecto de la desnutrición moderada y grave en la activación de proteínas que participan en la señalización del daño al ADN en linfocitos T y B de ratas de 21 días de edad”

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en B.E. Ana María González Gutiérrez

Comité Tutorial:

Directora

Dra. Edith Cortés Barberena

Asesoras

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Iztapalapa, Ciudad de México, septiembre de 2020.

Declaración de originalidad

La que suscribe Ana María González Gutiérrez, alumna del Doctorado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Efecto de la desnutrición moderada y grave en la activación de proteínas que participan en la señalización del daño al ADN en linfocitos T y B de ratas de 21 días de edad",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el comité del Posgrado en Biología Experimental, así como el honorable jurado para la obtención del grado de Doctora es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 10 de septiembre del 2020.

Atentamente



Ana María González Gutiérrez

Nombre y firma del alumno

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 10 de septiembre de 2020.

Comisión Académica del Posgrado
en Biología Experimental
Presente

La que suscribe Ana María González Gutiérrez alumno(a) con número de matrícula 2161801110, del Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "Efecto de la desnutrición moderada y grave en la activación de proteínas que participan en la señalización del daño al ADN en linfocitos T y B de ratas de 21 días de edad" a desarrollar en el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-Iztapalapa, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Ana María González Gutiérrez
Nombre completo y firma autógrafa*

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”.

Por este medio, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado con el número de registro: 284113

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Efecto de la desnutrición moderada y grave en la activación de proteínas que participan en la señalización del daño al ADN en linfocitos T y B de ratas de 21 días de edad", que presentó

M. en B.E. Ana María González Gutiérrez

El día 28 de septiembre del año 2020

Presidente

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz



Secretaria

Dra. Sara Frías Vázquez



Vocal

Dra. María del Carmen García Rodríguez



Vocal

Dr. Edmundo Bonilla González





Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00122
Matrícula: 2161801110

Efecto de la desnutrición moderada y grave en la activación de proteínas que participan en la señalización del daño al ADN en linfocitos T y B de ratas de 21 días de edad.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de septiembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MURIZ
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
DRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUES
DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaría la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ANA MARIA GONZALEZ GUTIERREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

VOCAL

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ

SECRETARIA

DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

COMITÉ TUTORAL

Dra. Edith Cortés Barberena

Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo

Departamento Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo

Departamento Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN)

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM

DEDICATORIAS PERSONALES

Primeramente, a DIOS, por iluminar cada instante de la vida.

GRACIAS POR TODO.

A mi madre, por su apoyo durante este trayecto.

A mi hermano, por tus momentos de sensatez.

A mis amigos, por su amistad y compañía.

A todas las ratitas que colaboraron para la realización de este trabajo.

in memoriam

Blandina Sebastiana Gutiérrez Martínez

Ejemplo de intensidad, fuerza, responsabilidad y entrega.

Gracias por tanto...

Haz lo que puedas, con lo que tengas, en donde estés.

Theodore Roosevelt

Mucha gente pequeña, en lugares pequeños, haciendo cosas pequeñas, puede cambiar el mundo.

Eduardo Galeano

verba movent, exempla trahunt

No existe ofensa tan odiosa como la heterodoxia en el comportamiento.

Los alumnos están destinados a tomar sobre sí graves responsabilidades y a enfrentarse con contingencias inesperadas.

Las personas que no se conforman con la ortodoxia, que tienen ideas propias. En una palabra, personas que son alguien.

Me interesa la verdad. Amo la ciencia. Pero la verdad es una amenaza, y la ciencia un peligro público.¹

Tú sigue siendo el rebelde que el mundo no cree que necesita.²

Brave New World. Huxley A., 1932. ¹ Caruso, D. J. (2017). xXx: Reactivated. ²

DEDICATORIAS ACADÉMICAS

Agradezco al grupo del Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo,
conformado por las Dras. Ortiz, Cortés, Rodríguez y Cervantes.

A los miembros del jurado, por las observaciones para la mejora de este
trabajo. Dras. Ortiz, García y Frías, así como al Dr. Bonilla.

A todos esos seres que, en momentos de necesidad, me brindaron un espacio
en su laboratorio y en su corazón.

Esta revolución realmente revolucionaria deberá lograrse, no en el mundo externo, sino en las almas y en la carne de los seres humanos.

Emplear la ciencia aplicada, no como un fin para el cual los seres humanos deben ser tenidos como medios, sino como el medio para producir una raza de individuos libres.

No cabe civilización alguna sin estabilidad social. Y no hay estabilidad social sin estabilidad individual.

No basta que las frases sean buenas; también debe ser bueno lo que se hace con ellas.

Un hombre puede sonreír y sonreír y ser un villano. ¹

Que cada uno de ustedes vea no sólo sus propios intereses, sino también los intereses de los demás.

Nadie ha visto, oído o imaginado jamás lo que Dios le tiene preparado. ³

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| ABREVIATURAS | i |
| RESUMEN..... | v |
| ABSTRACT..... | vii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Desnutrición..... | 1 |
| 1.2 Modelos experimentales para su estudio | 4 |
| 1.3 Daño al ADN..... | 5 |
| 1.4 ANTECEDENTES | 8 |
| 1.4.1 Un tejido móvil: la sangre | 8 |
| 1.4.2 Órganos hematolinfoides..... | 10 |
| 1.4.2.1 Bazo | 10 |
| 1.4.3 Inmunidad..... | 13 |
| 1.4.3.1 Linfocitos T | 14 |
| 1.4.3.2 Linfocitos B | 15 |
| 1.4.4 Epigenética..... | 16 |
| 1.4.5 Desnutrición y daño citogenético..... | 17 |
| 1.4.6 El dinámico nucleosoma..... | 19 |
| 1.4.7 Complejo proteico MRN..... | 20 |
| 1.4.8 Proteína Ataxia Telangiectasia Mutada | 23 |
| 1.4.9 Histona variante H2AX | 25 |
| 1.4.10 Guardián del genoma: proteína P53..... | 29 |
| 1.4.11 Vía de reconocimiento del daño al ADN por rupturas de doble cadena | 32 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... | 35 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 35 |
| 5. OBJETIVO GENERAL..... | 35 |
| 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 35 |
| 6. DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 37 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 38 |
| 7.1 Desnutrición experimental..... | 38 |
| 7.2 Grado de desnutrición..... | 38 |
| 7.3 Extracción de sangre y bazo..... | 39 |
| 7.4 Viabilidad celular..... | 39 |
| 7.5 Ciclo celular..... | 40 |
| 7.6 Marcaje de linfocitos T y B en sangre..... | 41 |
| 7.7 Marcaje de linfocitos T y B en bazo..... | 41 |
| 7.8 Marcaje de gamma H2AX y ATM fosforilada en Ser 1981..... | 42 |
| 7.9 Marcaje de P53 sin fosforilar y fosforilada en Ser 15..... | 42 |
| 7.10 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO..... | 43 |
| 7.10.1 Selección de la región de análisis..... | 44 |
| 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 48 |
| 9. RESULTADOS..... | 48 |
| 9.1 Desnutrición experimental..... | 48 |
| 9.2 Porcentaje de células viables..... | 51 |
| 9.3 Citometría de Flujo..... | 52 |
| 9.3.1 Porcentaje celular en las fases del ciclo celular..... | 52 |
| 9.3.2 Porcentaje celular pATM/gH2AX en sangre..... | 54 |

| | |
|--|-----|
| 9.3.3 Porcentaje celular pATM/gH2AX en bazo | 55 |
| 9.3.4 Porcentaje celular P53 en sangre | 57 |
| 9.3.5 Porcentaje celular P53 en bazo..... | 60 |
| 9.3.6 Porcentaje positivo a las proteínas fosforiladas de acuerdo con el sexo | 62 |
| 10. DISCUSIÓN | 72 |
| 10.1 Modelo para inducir desnutrición..... | 72 |
| 10.2 Efecto de la desnutrición en los tejidos analizados | 74 |
| 10.3 Ataxia Telangiectasia Mutada, la histona H2AX y las rupturas de doble cadena | 77 |
| 10.4 La proteína P53 y las rupturas de doble cadena | 83 |
| 10.5 Comentarios generales..... | 88 |
| 10.6 Resumen gráfico de los hallazgos..... | 92 |
| 11. CONCLUSIONES | 94 |
| 11.1 CONSIDERACIONES FINALES..... | 96 |
| 11.2 PERSPECTIVAS | 97 |
| 12. REFERENCIAS | 98 |
| 13. ARTÍCULO..... | 126 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|--|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADN PKcs | Proteína cinasa dependiente del ADN |
| APC | Aloficocianina |
| ATM | Ataxia telangiectasia mutada |
| ATR | Ataxia telangiectasia relacionada con RAD3 |
| BER | Reparación por escisión de base |
| BN | Ratas bien nutridas |
| D.E. | Desviación estándar |
| DBD | Dominio de unión al ADN |
| DCP | Desnutrición calórico-proteica |
| DN | Ratas desnutridas |
| DNG | Desnutrición grave (3 ^{er} grado) |
| DNM | Desnutrición moderada (2 ^o grado) |
| DSB | Ruptura de doble cadena |
| E.E. | Error estándar |
| FITC | Fluoresceína |
| gH2AX | Histona variante H2AX fosforilada en la serina 139 |
| HSC | Célula madre hematopoyética |
| MMR | Reparación por mal apareamiento |
| MN | Micronúcleo |
| MPT | Modificación post traduccional |
| MRE11 | Proteína de recombinación meiótica 11 |
| MRN | Complejo formado por las proteínas MRE11, RAD50 y |
| NBS1 | |
| mTOR | Blanco de rapamicina en mamíferos |
| NBS1 | Proteína del síndrome de ruptura de Nijmegen 1 |
| NER | Reparación por escisión de nucleótidos |
| NHEJ | Unión de extremos no homólogos |
| P53-pSer15 | Proteína P53 fosforilada en la serina 15 |
| P53t | Proteína P53 sin fosforilar |
| PAF | Paraformaldehído |
| pATM | Ataxia telangiectasia mutada fosforilada en la serina |
| 1981 | |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| PE | Ficoeritrina |
| PerCP | Proteína de peridina clorofila |
| PI3K | Proteínas similares a fosfatidilinositol 3 cinasa |
| RAD50 | Proteína de reparación del ADN |
| RH | Recombinación homóloga |
| SMG1 | Proteína supresora con efecto morfológico en genitales 1 |
| SSB | Ruptura de cadena sencilla |
| TRRAP | Proteína asociada al dominio de |
| transformación/transcripción | |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diversas poblaciones generadas durante la hematopoyesis..... | 9 |
| Figura 2. Principales estructuras del bazo..... | 13 |
| Figura 3. Estructura de las proteínas que forman el complejo MRN..... | 22 |
| Figura 4. Estructura de ATM con dominios..... | 24 |
| Figura 5. Modificaciones postraduccionales en histonas..... | 28 |
| Figura 6. Sitios de fosforilación de P53..... | 31 |
| Figura 7. Vía canónica de reconocimiento del daño al ADN por rupturas de doble cadena..... | 33 |
| Figura 8. Planeación del trabajo experimental..... | 37 |
| Figura 9. Estrategia de análisis pATM y gH2AX..... | 45 |
| Figura 10. Estrategia de análisis P53 sin fosforilar y fosforilada en Ser 15 | 46 |
| Figura 11. Estrategia de análisis para ciclo celular..... | 47 |
| Figura 12. Resultados estadísticamente significativos obtenidos en el grupo de ratas con desnutrición moderada | 92 |
| Figura 13. Resultados estadísticamente significativos obtenidos en el grupo de ratas con desnutrición grave | 93 |
| Figura 14. Respuesta al daño del ADN por rupturas de doble cadena..... | 96 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Peso corporal y del bazo | 50 |
| Tabla 2. Déficit de peso del bazo y la relación existente entre el peso del bazo con el peso corporal | 51 |
| Tabla 3. Porcentaje celular viable | 52 |
| Tabla 4. Porcentaje de linfocitos de sangre periférica en las fases del ciclo celular..... | 52 |
| Tabla 5. Porcentaje de linfocitos de bazo en las fases del ciclo celular..... | 53 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Linfocitos T en sangre pATM/gH2AX | 54 |
| Gráfica 2. Linfocitos B en sangre pATM/gH2AX | 55 |
| Gráfica 3. Linfocitos T esplénicos pATM/gH2AX | 56 |
| Gráfica 4. Linfocitos B esplénicos pATM/gH2AX | 57 |
| Gráfica 5. Linfocitos T en sangre P53t/P53-pSer15..... | 58 |
| Gráfica 6. Linfocitos B en sangre P53t/P53-pSer15 | 59 |
| Gráfica 7. Linfocitos T en bazo P53t/P53-pSer15..... | 60 |
| Gráfica 8. Linfocitos B en bazo P53t/P53-pSer15..... | 61 |
| Gráfica 9. Comparación del porcentaje de linfocitos T en sangre pATM/gH2AX por sexo | 62 |

| | |
|---|----|
| Gráfica 10. Comparación del porcentaje de linfocitos B en sangre pATM/gH2AX por sexo..... | 63 |
| Gráfica 11. Comparación del porcentaje de linfocitos T en bazo pATM/gH2AX por sexo | 65 |
| Gráfica 12. Comparación del porcentaje de linfocitos B en bazo pATM/gH2AX por sexo | 66 |
| Gráfica 13. Comparación del porcentaje de linfocitos T en sangre P53t/P53-pSer15 por sexo | 67 |
| Gráfica 14. Comparación del porcentaje de linfocitos B en sangre P53t/P53-pSer15 por sexo..... | 68 |
| Gráfica 15. Comparación del porcentaje de linfocitos T en bazo P53t/P53-pSer15 por sexo..... | 70 |
| Gráfica 16. Comparación del porcentaje de linfocitos B en bazo P53t/P53-pSer15 por sexo..... | 71 |

RESUMEN

La desnutrición calórico-proteica (DCP) ocurre cuando se consumen nutrientes insuficientes para satisfacer las necesidades biológicas de un organismo. Se ha documentado una relación entre la desnutrición y el daño al ADN, de donde las rupturas de doble cadena de ADN (DSBs) son las más peligrosas. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto derivado de la desnutrición moderada y grave sobre las proteínas gH2AX, pATM, P53t+ y P53-pSer15+, que participan en la señalización del daño al ADN, en linfocitos T y B de ratas lactantes. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, y se indujo la desnutrición experimental por el método de competencia de alimento durante la lactancia al aumentar el número de crías por nodriza, trabajando con las que presentaron desnutrición moderada (DNM) y grave (DNG). Debido a su alta especificidad, el ensayo de la histona variante H2AX fosforilada asociada con pATM (Ser1981), seguido por el marcaje de P53 sin fosforilar (P53t+) y fosforilada (P53-pSer15+), combinado con citometría de flujo se utilizó en este trabajo para demostrar el impacto de la desnutrición en la respuesta al daño del ADN. Se observó que los linfocitos esplénicos T y B de ratas DNM y DNG tienen la capacidad de detectar daño al material genético al incrementarse el porcentaje de células pATM+; así mismo se observó un incremento en los linfocitos esplénicos T y B dobles positivos (pATM+/gH2AX+) en el grupo DNM. Las ratas con DNM y DNG mostraron un incremento en el porcentaje de linfocitos B gH2AX+ de bazo y sangre periférica. Mientras que, en las ratas DNG se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos B esplénicos dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+) y

P53-pSer15+; lo que podría indicar que la ruta de señalización se encuentra alterada. Los hallazgos del presente estudio nos permiten sugerir que la DNG compromete la respuesta celular del daño al ADN.

ABSTRACT

Protein-calorie malnutrition (PCM) occurs when insufficient nutrients are consumed to satisfy the biological needs of an organism. A relationship between malnutrition and DNA damage has been documented, of which DNA double-strand breaks (DSBs) are the most dangerous. The present work had as objective to analyze the effect derived from moderate and severe malnutrition on gH2AX, pATM, P53t+ and P53-pSer15+ proteins, which are involved in signaling DNA damage, in T and B lymphocytes from lactating rats. Wistar strain rats were used, and experimental malnutrition was induced by creating food competition during lactation by increasing the number of offspring per wet nurse, working with those who presented moderate (DNM) and severe (DNG) malnutrition. Due to its high specificity, the phosphorylated H2AX variant histone assay associated with pATM (Ser1981), followed by labeling of P53 unphosphorylated (P53t+) and phosphorylated (P53-pSer15+), combined with flow cytometry was herein used to demonstrate the impact of malnutrition on the DNA damage response. It was observed that splenic T and B lymphocytes from rats with severe PCM have the capacity to detect genetic material damage, to the increased number of pATM+, likewise an increase in the double-positive T and B splenic lymphocytes (pATM+/gH2AX+) was observed in the DNM group. DNM and DNG rats showed an increase in the percentage of spleen and peripheral blood gH2AX+ B lymphocytes. While, an increase in the percentage of double positive splenic B lymphocytes (P53t+/P53-pSer15+) and P53-pSer15+ was observed in DNG rats; this

could indicate alterations in the signaling pathway. The findings of the present study allow us to suggest that DNG compromises the cell DNA damage response.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desnutrición

A partir de julio del 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS), define la malnutrición como “las deficiencias, excesos o desequilibrios en la ingesta de nutrientes”; dentro de las que se encuentran la obesidad y la desnutrición (OMS, 2016). Así, la desnutrición calórico-proteica (DCP) es el estado patológico caracterizado por la disponibilidad reducida de nutrientes, provocando alteraciones en la composición y funciones del cuerpo (Gangadharan y cols., 2017). Dentro de los principales factores que promueven la generación de este padecimiento se encuentran la ingesta deficiente de nutrientes, su mala absorción, anomalías metabólicas y el aumento de los requerimientos de energía (Pashayee-khamene y cols., 2019).

Clínicamente como resultado de la DCP se encuentran alteraciones en diversos procesos metabólicos, cambios estructurales en los órganos linfoides que desembocan en su atrofia, modificación del ritmo idóneo de la hematopoyesis, disminución en la generación de células hematopoyéticas, alteración del sistema inmunológico innato y adaptativo generando inmunodepresión, así como leucopenia con procesos deteriorados (Santos y cols., 2017).

Anualmente, la desnutrición es la causa de por lo menos el 50% de todos los decesos en menores de 5 años a escala global (Khan y cols., 2019). Datos recientes indican que el número de personas que padecen hambre es de 820 millones y sigue

aumentando. El área geográfica más afectada incluye Asia, África, el Caribe y América Latina; cabe señalar que la prevalencia de la inseguridad alimentaria es más elevada en mujeres, lo anterior se observa marcadamente en América Latina (FAO y cols., 2019). Es importante agregar que el 90% de los estados de desnutrición son resultado de la subalimentación, ya sea por deficiencia en la cantidad o calidad de los alimentos (Gómez, 1946).

En México, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en conjunto con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) están por publicar los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). En los resultados preliminares difundidos se indica que en nuestro país el 7.4% de niños menores de cinco años presentan peso bajo, el 16.8% talla baja y el 2.2% mostraron emaciación (peso inferior al correspondiente con su estatura) (INSP, 2018). En conjunto, otro reporte resalta que la prevalencia de la desnutrición entre menores de cinco años no se ha reducido desde el año 2012 a la fecha (FAO, 2019).

Las tasas más altas de población carente de acceso a la alimentación en nuestro país se encuentran en Chiapas, Estado de México, Oaxaca, Puebla y Veracruz (FAO, 2019). Esta información, concuerda con el hecho de que las zonas rurales presentan el mayor porcentaje de inseguridad alimentaria leve, moderada y severa, dadas sus condiciones de vulnerabilidad (INEGI y cols., 2019).

Si bien la DCP tiene la capacidad de perjudicar a todos los órganos y sistemas del organismo que la padece, ejerce particular daño sobre los que presentan una alta tasa de renovación celular, como el linfohematopoyético (Hastreiter y cols., 2019). Lo

anterior, está relacionado con la atrofia de los órganos linfoides, así como con un menor recuento total linfocitario (Koethe y von Reyn, 2016).

Este padecimiento tiene un impacto deletéreo en el sistema inmunológico, que constituye de manera general, una respuesta inadecuada para el control de los patógenos. Si bien existen diversos reportes que sustentan el daño que la desnutrición le provoca a este sistema, aún falta información referente a los mecanismos moleculares que participan en torno a esto (Ibrahim y cols., 2017).

En nuestro país, la primera clasificación de la desnutrición fue establecida en 1946 por el pediatra mexicano Federico Gómez, desde entonces a dicha categorización se le asignó su nombre y es conocida como “Clasificación de Gómez”. Como indicador utilizó la relación peso para la edad y consta de tres grados que varían de acuerdo con la severidad de la falta de peso, tomando como peso ideal la mediana de una población de referencia (Gómez, 1946), el cual sigue vigente debido a que resulta muy útil para fines clínicos y de investigación:

- ◆ Primer grado o desnutrición leve: se presenta un déficit del 10 al 25.9% del peso con relación a la edad.
- ◆ Segundo grado o desnutrición moderada: déficit del 26 al 39.9%.
- ◆ Tercer grado o desnutrición grave: déficit a partir del 40%.

La desnutrición es un síndrome generado por el ser humano, que resulta importante estudiar, debido a la cantidad de individuos que la padecen y las secuelas que trae consigo (Batrouni y cols., 2016).

Las etapas tempranas del desarrollo (gestación y lactancia) son periodos críticos de plasticidad fisiológica, por lo que se identifican como vulnerables ante las lesiones provocadas por el entorno. Si la condición adversa se implementa durante estas etapas, el estado epigenético puede verse afectado y alterar las modificaciones covalentes del ADN y las histonas (de Morais y cols., 2019).

1.2 Modelos experimentales para su estudio

Los modelos animales proporcionan un entorno altamente controlado para probar hipótesis, imitando síntomas o aspectos particulares de alguna enfermedad o estado objetivo (Arakawa y Iguchi, 2018). Para estudiar los efectos de la desnutrición se han empleado animales como monos, cerdos y roedores, más específicamente ratones y ratas (Salameh y cols., 2019). El uso preferente de estos animales es debido a que presentan varias ventajas, por ejemplo, la posibilidad de realizar estudios *in vivo* e *in vitro*, la obtención de células provenientes de diferentes órganos, su ciclo de vida relativamente corto, además de su utilidad en diferentes etapas de la vida (prenatal, posnatal y adulta) (Arakawa, 2019).

Dentro de los métodos para inducir desnutrición a través de la dieta se encuentran la restricción calórica, una dieta deficiente de proteína y las dietas regionales. Por su parte, para inducir desnutrición durante la lactancia en modelos experimentales se utilizan principalmente dos métodos: en el primero una nodriza desnutrida alimenta a la camada con leche de baja calidad; el segundo método radica en incrementar el número de crías por nodriza, reduciendo así la cantidad de

alimento disponible y el consumo de leche por parte de las crías (Ortiz y cols., 1996; Salameh y cols., 2019).

Al generar la desnutrición experimental durante la lactancia por competencia de alimento, se está trabajando con un buen modelo de estudio para abordar los efectos de este padecimiento, puesto que esta etapa es crítica en el crecimiento y desarrollo del organismo, y sus efectos son más graves que los observados en adultos. Aunado a lo anterior, presenta ventajas: es un método altamente eficaz y reproducible al proveer de grandes cantidades de ratas desnutridas de segundo y tercer grado con un mínimo efecto en el índice de mortandad (Cortés y cols., 2001; Ortiz y cols., 1996).

1.3 Daño al ADN

Constantemente, la integridad genética de los organismos está expuesta a agentes genotóxicos capaces de provocar alteraciones orgánicas y/o funcionales. Los factores que principalmente se han identificado como capaces de inducir daño al material genético son el estilo de vida, los medicamentos, y el medio ambiente (Gómez-Meda y cols., 2016).

Miles de eventos dañinos hacia el ADN ocurren diariamente en cada célula del organismo, dichos sucesos genotóxicos pueden ser causados extrínsecamente por la radiación ionizante (IR), rayos UV, agentes alquilantes o productos químicos. Por otro lado, este daño puede tener un origen endógeno como la desaminación o depurinación, resultado inevitable de la hidrólisis, así como subproductos

metabólicos o especies reactivas de oxígeno (ERO). La respuesta al daño del ADN (DDR) la pueden desencadenar diferentes tipos de lesiones, dentro de las más frecuentes se encuentran las modificaciones oxidativas, las rupturas de cadena sencilla (SSBs), los enlaces cruzados entre cadenas, y las rupturas de doble cadena (DSBs), que son altamente citotóxicas y peligrosas, debido a que provocan una distorsión funcional de los programas genéticos de la célula, ya que pueden bloquear la transcripción y la duplicación, causar mutaciones, además se les ha relacionado con enfermedades neurológicas, envejecimiento, cáncer e inmunodeficiencia (Niedernhofer y cols., 2018; Ou y Schumacher, 2018; Zhu y cols., 2020). Para retomar el estado saludable, el sistema DDR actúa a través de las interacciones intra e intercelulares, permitiendo la detección del daño al ADN y su reparación (Situ y cols., 2019).

Posterior al daño en el ADN y la DDR, continúa la activación de los puntos de control de daño en el ADN que participan en las fases G1 y G2 (G1/S, S y G2/M), de manera que la segregación cromosómica se restringe hasta que el daño pueda repararse por medio de los sistemas de reparación propios para cada lesión (Di Sotto y cols., 2020). El sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) elimina las lesiones voluminosas del ADN; la reparación por escisión de base (BER) se encarga de las lesiones que causan distorsiones en la estructura de la hélice de ADN; la reparación por mal apareamiento (MMR) corrige las bases desapareadas (Campos y Clemente-Blanco, 2020). Por otro lado, debido a las consecuencias que traen consigo las DSBs, resulta importante su reparación con el fin de mantener la

estabilidad genómica y la homeostasis celular; para lo cual las células han desarrollado dos mecanismos principales: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (RH). El primer mecanismo, NHEJ, puede unir dos extremos rotos en ausencia de homología de secuencia y está activo durante la interfase; por su parte, la RH utiliza secuencias homólogas como plantilla para reparar el ADN roto y principalmente actúa durante las fases S y G2, cuando hay apareamiento de cromátidas hermanas (Anand y cols., 2019; Batenburg y cols., 2017).

La relación existente entre la desnutrición y el daño genético ha sido objeto de estudio en modelos animales y seres humanos (Elsayh y cols., 2013). Implementando diferentes dietas como alta en grasas, baja en proteínas y restricción calórica, se ha demostrado que las condiciones dietéticas extremas afectan múltiples vías de detección de nutrientes y pueden causar cambios globales en la modificación de las histonas. Específicamente en ratas, se ha observado un decremento en la metilación de las histonas H3 y H4, resultado de la restricción calórica; por otro lado, la dieta baja en proteínas durante la gestación ha mostrado disminución en la acetilación de la histona H3, con resultados por el momento contradictorios en la metilación (Molina-Serrano y cols., 2019).

1.4 ANTECEDENTES

1.4.1 Un tejido móvil: la sangre

Se designa hematopoyesis, al proceso por el cual se producen las células de la sangre en la médula ósea, y está modulada por factores que influyen en el metabolismo celular, como las señales inflamatorias y la disponibilidad de nutrientes (Pernes y cols., 2019; Yumine y cols., 2017). La producción de las células sanguíneas inicia con la inactividad de las células madre hematopoyéticas (HSCs), continúa con su compromiso de linaje y adquisición gradual específica de identidades mieloides o linfoides. En el transcurso se suscitan cambios graduales en los patrones de proteínas, teniendo en cuenta los reguladores del ciclo celular y los factores de transcripción, la mayoría objetivos de miRNA (Rasko y Wong, 2017).

Cada tipo celular presente en la sangre cuenta con funciones particulares. Las plaquetas colaboran en el mantenimiento de la hemostasia; los eritrocitos, también llamados glóbulos rojos, se encargan de transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos, así como de eliminar el dióxido de carbono. Los leucocitos, o glóbulos blancos, participan en la reacción inflamatoria y la generación de respuestas inmunológicas e incluyen granulocitos (este grupo reúne neutrófilos, basófilos, eosinófilos y mastocitos), macrófagos, células dendríticas y linfocitos (que comprende células asesinas naturales, células T y B) (Figura 1) (Antoniani y cols., 2017).

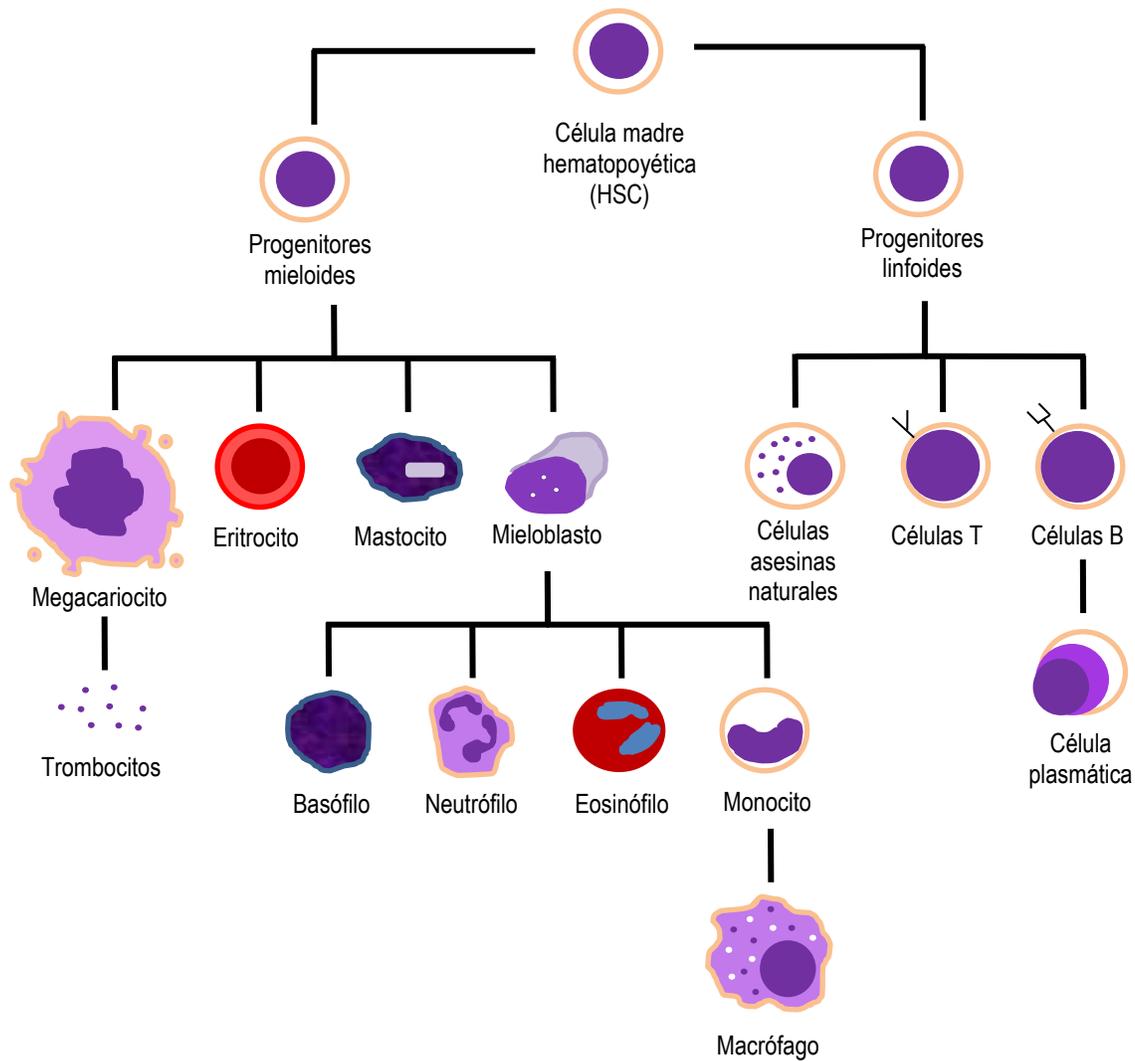


Figura 1. Diversas poblaciones generadas durante la hematopoyesis. La célula madre hematopoyética (HSC), posterior a su activación, diverge en progenitores con la facultad de proseguir la diferenciación (Modificado de Nobili y cols., 2016).

1.4.2 Órganos hematolinfoides

En conjunto, se encargan de producir y mantener las células sanguíneas, realizar la vigilancia y montar reacciones inmunológicas utilizando la sangre y la linfa para el transporte. Estas funciones se distribuyen entre los órganos clasificados como primarios o centrales, dentro de los que se encuentran la médula ósea y el timo, y los secundarios o periféricos, que integran el bazo, los ganglios linfáticos, los tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT) y los grupos linfoides asociados a la serosa (SALC) (Willard-Mack y cols., 2019).

Para hacer frente a las infecciones los órganos secundarios cumplen con tres funciones: capturan patógenos con el fin de reducir su propagación, promueven el contacto de las células presentadoras de antígeno (APCs) con linfocitos específicos para inducir una respuesta inmunológica adecuada y proporcionan los factores necesarios para la diferenciación y supervivencia de los linfocitos (Junt y cols., 2008).

1.4.2.1 Bazo

Este órgano se encuentra ubicado en el abdomen debajo del diafragma, y es la mayor fuente secundaria de tejido linfoide, al contener aproximadamente el 25% del número total de linfocitos. Sus principales funciones son filtrar la sangre mediante la eliminación de glóbulos rojos senescentes, reciclar el hierro, además de ser un sitio importante para la generación de respuesta inmunológica innata y adaptativa. Principalmente lo componen dos zonas funcionalmente distintas: la pulpa roja y la

pulpa blanca; por su parte al límite entre estas dos regiones se le conoce como zona marginal (Figura 2) (Fujinami y cols., 2018; Khairallah y cols., 2017; Thomson y cols., 2017).

La pulpa roja actúa como el sistema de filtración de la sangre del cuerpo; digiere los eritrocitos y recicla el hierro de la población de macrófagos. (Khairallah y cols., 2017). Presenta circulación abierta y está constituida por sinusoides, canales vasculares revestidos por células endoteliales y macrófagos que detectan y eliminan patógenos y antígenos solubles de la circulación sistémica (Duarte-Neto y cols., 2019). Por su parte, la pulpa blanca es el componente linfoide del bazo, está compuesta por la vaina linfoide periarteriolar (PALS, zona de células T alrededor de una arteriola central) y los folículos circundantes (zonas de células B) (Khairallah y cols., 2017). Mientras que, las quimiocinas específicas controlan la organización y el mantenimiento correcto de la pulpa blanca, atrayendo a las células T y B a sus espacios específicos. En PALS las células T interactúan con células dendríticas (DC) y las células B que pasan, mientras que en los folículos circundantes puede tener lugar la expansión clonal de las células B, generando el cambio de isotipo y la hipermutación somática (Mebius y Kraal, 2005).

La zona marginal es un área discreta que funciona como un filtro inmunológico donde quedan atrapados los antígenos transportados por la sangre, podemos encontrar principalmente una población de linfocitos B, macrófagos, células dendríticas en roedores y en seres humanos células T (Hendricks y cols., 2019; Satoh y cols., 2019).

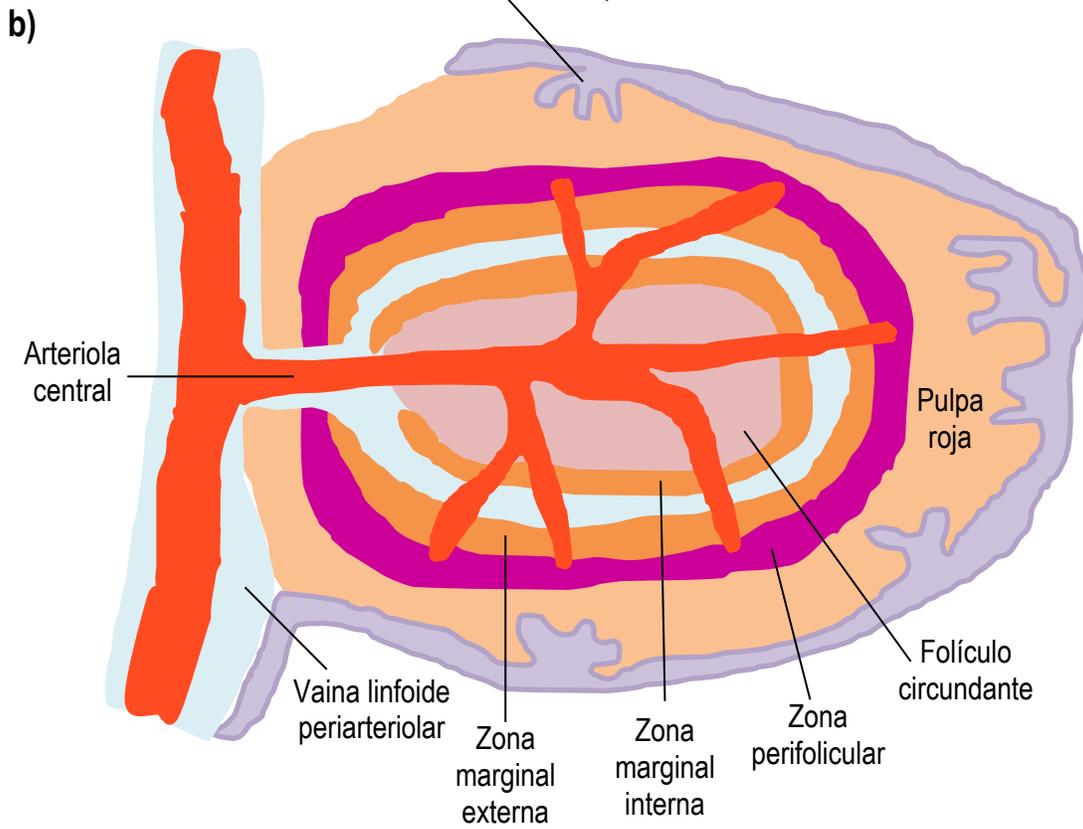
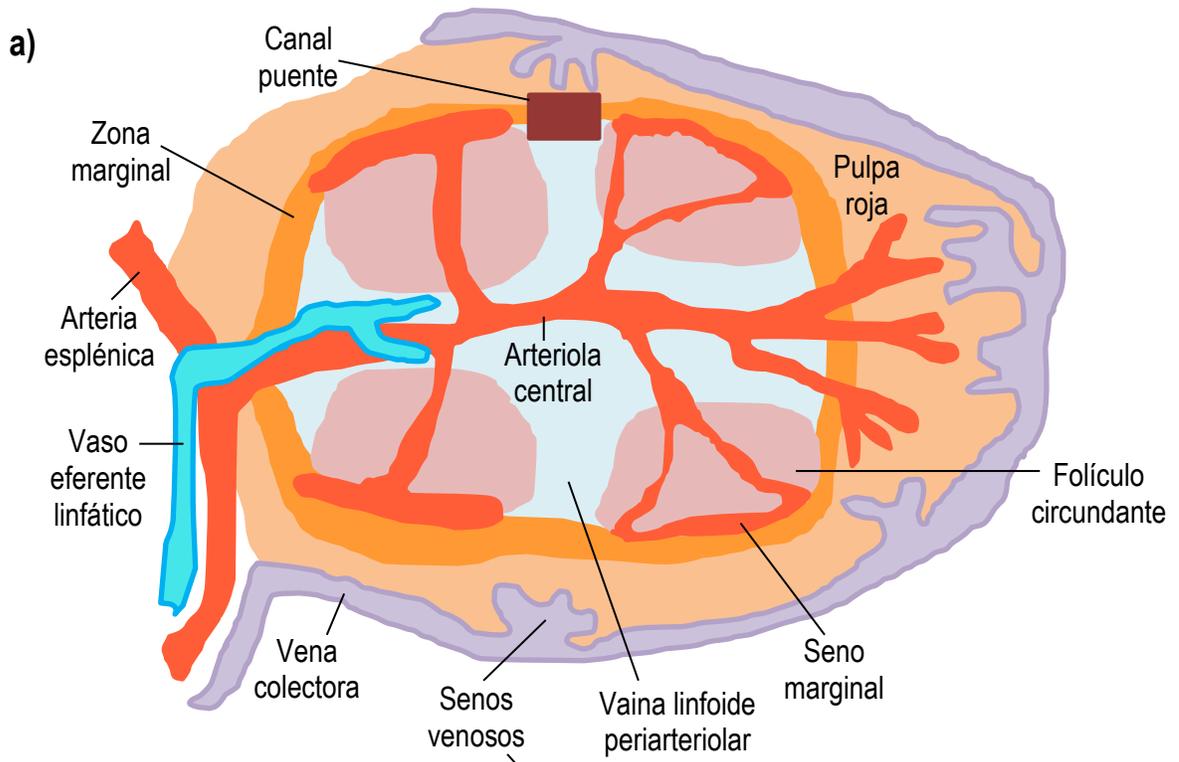


Figura 2. Principales estructuras del bazo. Se muestran las principales zonas del bazo en a) ratas y ratones: los linfocitos y las células dendríticas dejan el torrente sanguíneo desde el seno marginal, que se encuentra entre la pulpa blanca y la zona marginal. Los canales puente de la zona marginal promueven un mayor tránsito hacia la pulpa blanca; las células B de la zona marginal se desplazan entre esta zona y los folículos circundantes (zonas de células B). Si las células B foliculares quieren abandonar el folículo, lo hacen a través de la zona marginal. Por su parte, las células T efectoras recién generadas migran desde la vaina linfoide periarteriolar (PALS, o zona de células T) a la pulpa roja a través de canales puente. b) seres humanos: El compartimiento adicional en los seres humanos es la zona perifolicular, que se encuentra entre la zona marginal y la pulpa roja; contiene espacios llenos de sangre sin un revestimiento endotelial, al igual que la pulpa roja. Por lo tanto, es de suponer que los linfocitos entran a la zona marginal desde la circulación abierta de la zona perifolicular y luego transmigran a la pulpa blanca. El bazo en el ser humano carece de senos marginales (Modificado de Schulz y cols., 2016).

1.4.3 Inmunidad

Los organismos vivos han desarrollado sistemas de defensa con la capacidad de reconocer, controlar y/o eliminar la mayoría de patógenos con los que tienen contacto durante su vida, lo anterior se lleva a cabo por una red multifacética de órganos, tejidos, células, proteínas y productos químicos especializados responsables de defender al organismo; esta compleja red es llamada sistema inmunológico y se clasifica en inmunidad innata (o no específica) y adaptativa, también llamada específica o adquirida (Carr y Maggini, 2017; Gourbal y cols., 2018).

Esta última resalta debido a su especificidad, dada por la recombinación genética, y la capacidad de acumular memoria inmunológica; dentro de este tipo de

inmunidad se encuentran los linfocitos T y B. Estas células cumplen funciones muy importantes, lo cual implica una interacción multidireccional fuertemente regulada con las células dendríticas (u otras APCs); lo anterior, activa, induce y promueve vías efectoras inmunológicas específicas, con el fin de responder más rápido y fuerte ante la presencia de algún patógeno (Müller y cols., 2019; Netea y van der Meer, 2017).

Existen múltiples factores endógenos y exógenos que pueden influir sobre el sistema inmunológico y afectar su función, dentro de los que se encuentran el sexo, la edad, el estrés, la exposición a compuestos tóxicos, el ejercicio, el tabaquismo y la nutrición (Claus y cols., 2016).

1.4.3.1 Linfocitos T

Las células T se originan en la médula ósea y se transportan al timo para su desarrollo (Xu H. y cols., 2016); la vía Notch es crítica para que se lleve a cabo este proceso (Lazare y cols., 2014). Las células T vírgenes al salir del ciclo celular activo, existen en un estado quiescente (G0) caracterizado por su tamaño celular pequeño; los circuitos moleculares por los cuales estas células salen de la quiescencia siguen siendo poco conocidos (H. Tan y cols., 2017). El metabolismo de las células T está determinado por varios factores: el estado metabólico interno de la célula, el equilibrio entre los metabolitos internos, el estado de energía y la disponibilidad de nutrientes (Kumar, 2018).

Para que se lleve a cabo adecuadamente la diferenciación y maduración de las células T se requiere vitamina C. Particularmente para regular su maduración,

esta vitamina actúa a través de mecanismos epigenéticos, como la desmetilación de histonas (Carr y Maggini, 2017). Las células T ayudan a los linfocitos B para que puedan llevar a cabo siete funciones distintas que son: proliferación, supervivencia, diferenciación de células plasmáticas, hipermutación somática, recombinación de cambio de clase, adhesión y atracción (Crotty, 2015).

Se ha reportado que la falta de nutrientes disminuye la función y producción de las células T (Chinen y Shearer, 2010). Así mismo, su activación y diferenciación adecuadas requieren de la integridad de los genes que codifican los principales factores clave, lo que a su vez puede depender de diferentes factores ambientales, que pueden influir cambiando el perfil epigenético de las células T, afectar su expresión génica y modificar estos procesos celulares (Müller y cols., 2019).

1.4.3.2 Linfocitos B

Dentro de esta población se pueden diferenciar dos linajes principales: células B1, que se localizan en el bazo, el peritoneo y los sitios de la mucosa; se generan principalmente en el hígado fetal y se mantienen mediante la autorrenovación. Por otro lado, las células B2 se generan en la médula ósea durante toda la vida y se encargan de formar la mayor parte del grupo de células B. Lo que sucede brevemente es lo siguiente: las HSCs proliferan generando células pro-B que se desarrollan en células pre-B sometándose a la recombinación VDJ en el locus de la cadena pesada y ligera de Ig. Las células B inmaduras salen de la médula ósea como células B de transición que viajan a través del sistema circulatorio al bazo y a

través de la zona de células T. Es aquí donde se comunican con las células T activadas, para completar su maduración (Burrows y Maxwell, 2017; Thomson y cols., 2017).

1.4.4 Epigenética

El ADN es el molde para que se lleven a cabo procesos como la duplicación y la transcripción, por lo que mantener la integridad de esta información resulta fundamental para la salud celular y del organismo (Tubbs y Nussenzweig, 2017). Para garantizar la estabilidad de la secuencia y la estructura del ADN, las células detectan, señalan y reparan las lesiones utilizando mecanismos específicos, coordinándose con la progresión del ciclo celular, la transcripción y la duplicación (Stingele y cols., 2017).

Con todo y que el ADN codifica nuestros genes, estos no siempre se expresan, el ADN no siempre se transcribe en ácido ribonucleico (ARN) y el ARN no siempre se traduce en proteínas; lo anterior es debido en parte a la epigenética. La epigenética incluye las “marcas” químicas heredables que se encuentran en y alrededor del genoma, influyendo en la expresión génica de manera controlada y selectiva. Los principales mecanismos epigenéticos que participan en la regulación de la expresión génica son la metilación del ADN, los pequeños ARN no codificantes y las modificaciones post-traduccionales (MPTs) de histonas; colaboran en diversos procesos biológicos al intervenir en la estructura y organización de la cromatina.

Pueden ser afectados por factores ambientales como la dieta, el estrés, la contaminación, entre otros (Franzago y cols., 2019; Liyanage y cols., 2014).

1.4.5 Desnutrición y daño citogenético

En la literatura, varios reportes en modelos experimentales y humanos evidencian el vínculo existente entre la DCP, resultado del consumo escaso de nutrientes para satisfacer las necesidades biológicas del organismo, y el daño al material genético (Ortiz y cols., 2004). Como ejemplo, Betancourt y colaboradores observaron en células de médula ósea provenientes de ratas con DCP grave, alta frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas, comparada con el grupo testigo BN (Betancourt y cols., 1986). Posteriormente, detectaron el daño al ADN en linfocitos y leucocitos totales de niños con desnutrición de 2^o y 3^{er} grado, efecto de infecciones graves y su tratamiento farmacológico (Betancourt y cols., 1995); en el mismo año Ortiz y cols. evidenciaron el aumento en la frecuencia de MN en linfocitos de bazo de ratas con desnutrición grave, comparado con el grupo BN (Ortiz y cols., 1995).

Posteriormente, se observó la frecuencia alta de MN en linfocitos (que aumenta al adicionar mitomicina C, MMC) de niños con DCP moderada y grave, en comparación con niños sanos bien nutridos (Ortiz y cols., 1997). Además, se demostró que la DCP grave, en ratas, está asociada con daño al material genético en bazo, médula ósea y sangre periférica utilizando ensayo cometa (Cortés y cols., 2001). Utilizando esta misma técnica, en 2002 se detectó el daño al ADN inducido

con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a diferentes tiempos de tratamiento (0, 5, 15, 30 y 60 min.) en linfocitos de infantes bien nutridos y desnutridos, observando un decremento en la capacidad de reparación del ADN en el grupo con desnutrición (González y cols., 2002a). El mismo grupo de trabajo, utilizando electroforesis unicelular analizó muestras de niños desnutridos y bien nutridos, previa y posteriormente al tratamiento con diferentes antibióticos. Los resultados indican que los niños desnutridos tienen daño al material genético antes de la medicación y ambos grupos después del tratamiento con los fármacos, siendo mayor en el grupo desnutrido (González y cols., 2002b).

En 2004, Ortiz y cols. observaron un aumento en la frecuencia de reticulocitos (RET) micronucleados (RET-MN) en ratas con desnutrición grave (Ortiz y cols., 2004). Para evaluar el daño al ADN, otros órganos de ratas desnutridas utilizados han sido cerebro, hígado, riñón y testículo; los datos muestran niveles de daño cercanos al grupo testigo en riñón y cerebro, mientras que en hígado y testículo existe un incremento utilizando ensayo cometa (Betancourt y cols., 2005). Por otro lado, se observó que la frecuencia alta de MN en RET de sangre periférica derivada de la desnutrición grave en ratas, aumenta al administrar un medicamento utilizado en infantes para el tratamiento de infecciones respiratorias: trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) (Ortiz y cols., 2011); otro reporte indica una frecuencia alta de MN en RET de niños con DCP moderada y grave, sugiriendo que las infecciones bacterianas y la desnutrición inducen daño al ADN (Cervantes-Ríos y cols., 2012). Así mismo, en 2014 muestran que niños con desnutrición moderada y

grave presentan una alta frecuencia de MN en RET, siendo en su mayoría de tipo clastogénico; este tipo de MN surgen como resultado de DSBs (Cervantes-Ríos y cols., 2014).

MacFarlane y cols. indican que, en ratones alimentados con una dieta deficiente de ácido fólico, existe una frecuencia mayor de MN en RET y eritrocitos normocromáticos (NCE) (MacFarlane y cols., 2015). Así mismo, se muestra daño mayor en el ADN, en los grupos de ratones desnutridos y bien alimentados infectados con *L. loboi*, utilizando ensayo cometa (Sierra y cols., 2015).

1.4.6 El dinámico nucleosoma

En el núcleo celular la información genética se encuentra “empaquetada” a través de la asociación del ácido desoxirribonucleico (ADN) con proteínas globulares denominadas histonas. A la unidad estructural básica de empaquetamiento, se le conoce como nucleosoma, sin embargo, cuando fue descubierto se le nombró “cuerpo ν ” (Koyama y Kurumizaka, 2018). Está compuesto por un par de cada una de las histonas canónicas o centrales H2A, H2B, H3 y H4, que forman el “octámero” alrededor del cual se enrolla 1.7 veces el ADN, el equivalente a 147 pb. La histona H1 se encarga de estabilizar la estructura de la cromatina, uniéndose al nucleosoma y al ADN extranucleosómico (Corujo y Buschbeck, 2018).

El nucleosoma juega un papel importante en actividades moleculares como la transcripción, duplicación y reparación del ADN, así como en el corte y empalme alternativo del ARN. Dentro de los factores que pueden influenciar la posición del

nucleosoma en la secuencia del genoma se encuentran las preferencias del nucleosoma por ciertas secuencias de ADN, factores de remodelación de la cromatina, metilación del ADN, factores de transcripción (TF), modificación de histonas, contenido de nucleótidos, propiedades fisicoquímicas, variantes de histonas, entre otras (Cai y cols., 2015).

1.4.7 Complejo proteico MRN

Consiste en un heterotrímero altamente conservado formado por la proteína de recombinación meiótica 11 (MRE11), la proteína de reparación del ADN RAD50 (RAD50) y la proteína del síndrome de ruptura de Nijmegen 1 (NBS1) (Figura 3). Es el principal complejo catalítico que participa en la detección y el inicio de la vía de respuesta ante el daño al ADN por DSBs (Situ y cols., 2019). El complejo MRN participa en el mecanismo de reparación NHEJ, así como en la RH; puede unir físicamente los extremos del ADN y tiene un papel enzimático importante en la reparación debido a la actividad nucleasa de Mre11, razón por la cual es uno de los primeros factores para detectar las DSBs. MRN se requiere para señalar la presencia de este tipo de lesiones a través de la cinasa ATM, lo cual es posible mediante la interacción conservada entre NBS1 y esta cinasa; lo anterior, permite que ATM se reclute y active para trabajar en este tipo de lesiones en el ADN (Anand y cols., 2019; Ho y cols., 2018).

Comenzando a partir del extremo amino N-terminal, MRE11 contiene un motivo nucleasa, dentro del cual se encuentra el sitio de unión a NBS1,

posteriormente dos dominios de unión al ADN (DBDs) cercanos al extremo carboxilo C-terminal y en medio de ellos, un motivo de unión a RAD50. Los DBDs y el motivo nucleasa permiten que la actividad exonucleasa 3'-5' y endonucleasa 5'-3' que cortan los extremos del ADN generen ADN monocatenario 3' para reparación adicional (Bian y cols., 2019).

Pertenece a la familia de las proteínas del mantenimiento estructural de cromosomas (SMC) y a la familia de las ATPasas del tipo ABC, RAD50 es la subunidad más grande del complejo MRN con 1312 aminoácidos. Posterior a la unión de ATP, RAD50 se cierra en una conformación rígida y única donde ambos extremos de la proteína, amino y carboxilo están interactuando entre sí, formando un dominio ABC ATPasa principal, formando un surco central donde se puede acomodar ADN bicatenario, impidiendo su acceso al sitio activo de la nucleasa MRE11. Sin embargo, lo anterior se puede revertir a través de la hidrólisis del ATP, pues se genera un estado estructural más abierto que hace que el ADN sea accesible para MRE11 (Lafrance-Vanasse y cols., 2015; Syed y Tainer, 2018).

Por su parte, NBS1 es específico de eucariotas, actúa como regulador y sección de reclutamiento de proteínas. Está constituido por 754 aminoácidos, cercanos al extremo NH₂ se encuentran un dominio asociado a cabeza de horquilla (FHA) y dos dominios BRCA1 C-terminal (BRCT), que forman el núcleo de unión a proteínas fosforiladas. Cercanos al C-terminal NBS1 presenta dos sitios de interacción, uno para MRE11 y otro para ATM (Anand y cols., 2019; Bian y cols., 2019). Cabe mencionar que realiza interacciones físicas y funcionales con la enzima

modificadora de histonas RNF20, así como con el factor de remodelación de la cromatina, nucleolina; en las vías de control del ciclo celular dependientes de ATM y la reparación de DSBs, estas interacciones son clave (Saito y cols., 2015).

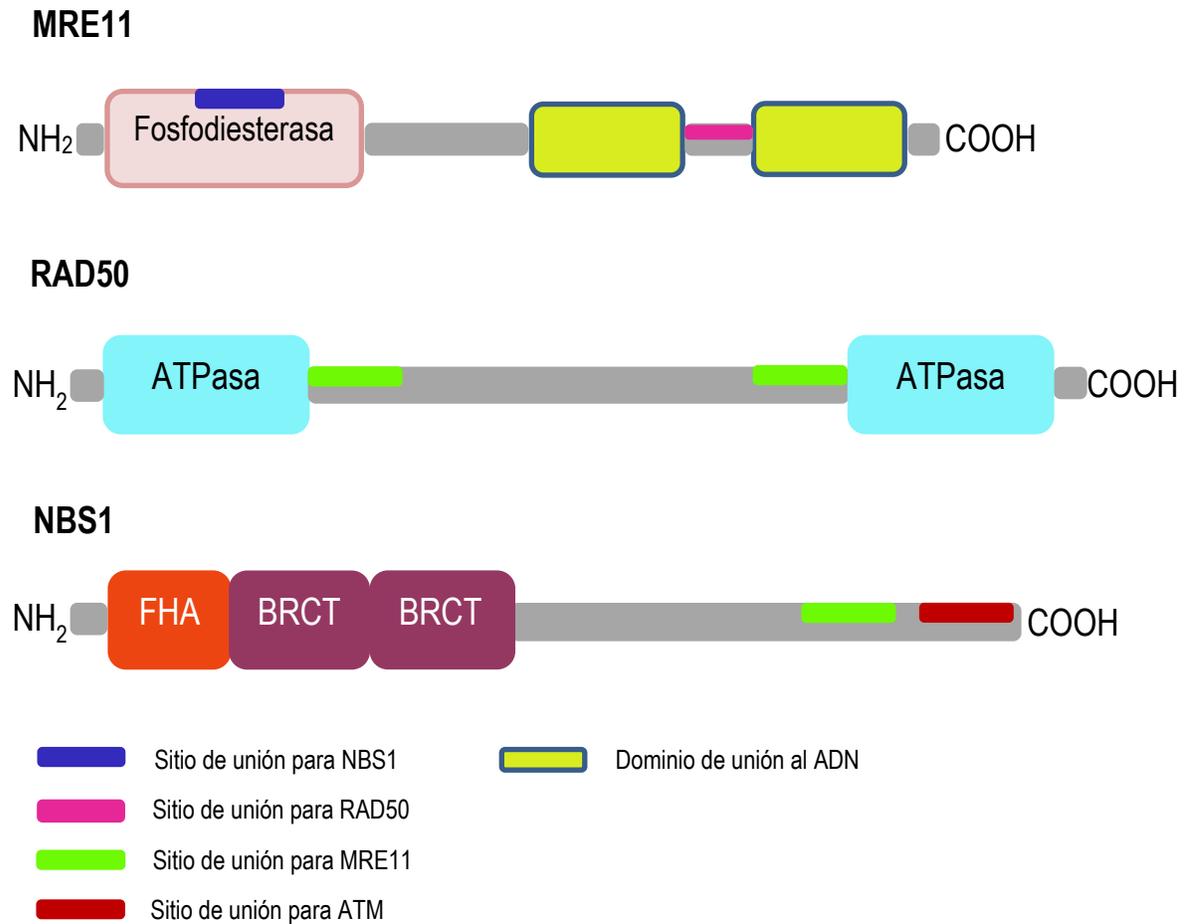


Figura 3. Estructura de las proteínas que forman el complejo MRN. El complejo MRN está formado por tres proteínas: MRE11 (proteína de recombinación meiótica 11) que presenta un sitio de unión para la proteína del síndrome de ruptura de Nijmegen 1 (NBS1) y otro para la proteína de reparación del ADN (RAD50); también cuenta con dos sitios de unión al ADN (DBDs). RAD50 tiene dos dominios ATPasa y dos sitios de unión para MRE11; y NBS1 que tiene un dominio asociado a

cabeza de horquilla (FHA), dos dominios BRCT y dos sitios de unión, uno para MRE11 y otro para la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) (Modificado de Situ y cols., 2019).

1.4.8 Proteína Ataxia Telangiectasia Mutada

El síndrome de Louis-Bar es una enfermedad caracterizada principalmente por degeneración cerebelosa que deriva en falta de coordinación voluntaria del movimiento, vasos sanguíneos dilatados, sensibilidad a la IR e inmunodeficiencias variables. Es causada por mutaciones en el gen *ATM* (del acrónimo ataxia telangiectasia mutada), localizado en el brazo largo del cromosoma 11 en la región q23 (Guleria y Chandna, 2016).

En la superfamilia de las proteínas similares a fosfatidilinositol 3 cinasa, PI3K (PIKK) se encuentran ataxia telangiectasia relacionada con RAD3 (ATR), la proteína cinasa dependiente del ADN (ADN PKcs), blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), la proteína asociada al dominio de transformación/transcripción (TRRAP), la proteína supresora con efecto morfológico en genitales 1 (SMG1) y ATM. Estos miembros comparten cierta homología en el dominio PI3K cinasa, específicamente en la región que contiene los residuos indispensables para coordinar el ATP y estabilizar la reacción de fosforilación (Adamowicz, 2018; Paull, 2015).

Individualmente ATM es una proteína cinasa serina/treonina que consta de 3056 aminoácidos y un peso molecular de 350 kDa. Su estructura a partir del extremo NH₂ inicia con la región de repeticiones HEAT (**H**untington, factor de **E**longación 3, subunidad de la proteína fosfatasa **2A** y **TOR1**), y continúa con tres

dominios que se pueden diferenciar: FAT (FRAP-ATM-TRAPP), dominio cinasa y FATC (FAT carboxilo terminal) (Figura 4) (Adamowicz, 2018). La razón por la cual los dominios FAT y FATC se encuentran “protegiendo” la región correspondiente al dominio cinasa, es debido a que se encargan de modular la actividad y función cinasa de ATM (Stagni y cols., 2014).



Figura 4. Estructura de ATM con dominios. De izquierda a derecha, comienza con la región de repeticiones HEAT (Huntington, factor de Elongación 3, subunidad de la proteína fosfatasa 2A y TOR1), y 3 dominios que se pueden distinguir: FAT (FRAP-ATM-TRAPP), dominio cinasa y FATC (FAT carboxilo terminal). Nótese que el dominio cinasa se encuentra en medio de FAT y FATC, que se encargan de modular su actividad (Modificado de Adamowicz, 2018).

La existencia catalíticamente inactiva de esta proteína, es como un homodímero no covalente en la mayoría de los tipos celulares y su ubicación es predominantemente nuclear; se requiere del complejo MRN para una activación óptima de ATM posterior a la inducción de DSBs (Paull, 2015). Una vez activa, tiene la capacidad de fosforilar una gran cantidad de proteínas en diversas vías de DDR

(Gavish-Izakson y cols., 2018). Se cree que la autofosforilación de ATM tiene lugar en el nucleoplasma (Falck y cols., 2005).

Dentro de los sitios importantes de autofosforilación en ATM se encuentran Ser367, Thr1885, Ser1893, Ser1981 y Ser2996; los tres primeros se encuentran en la región de repeticiones HEAT, el cuarto en el dominio FAT y el quinto en el dominio FATC. Particularmente los residuos Ser367 y Ser1893 contribuyen a la activación de ATM y para mejorarla, TIP60 la acetila en Lys3016. Por otra parte, en Cys2991 se lleva a cabo la formación de puentes disulfuro para su activación posterior al estrés oxidante (Shibata y Jeggo, 2018).

Cada cinasa precisa una proteína de unión accesoria específica para el reclutamiento estable en los sitios de daño al ADN; para ATM es NBS1, ATRIP para ATR y KU80 para DNA-PKcs (Blackford y Jackson, 2017). Aunque varias cinasas parecen estar implicadas en la fosforilación de gH2AX, numerosos estudios han demostrado que ATM es el principal responsable de este proceso, lo que permite la coordinación precisa del reclutamiento de muchos componentes de la maquinaria de reparación a los DSBs (Moeglin y cols., 2019).

1.4.9 Histona variante H2AX

También existen histonas variantes (llamadas de reemplazo) además de las histonas centrales, que presentan estructuras y funciones particulares y comparten homología en la secuencia de aminoácidos con sus histonas canónicas (Koyama y Kurumizaka, 2018). La presencia de formas variantes de histonas y su extensa

variedad de MPTs generan alteraciones en el arreglo del nucleosoma y establecen un nivel adicional para la regulación de la expresión y reparación del ADN (Govaert y cols., 2016).

Perteneciente a la familia de las histonas H2A, la histona variante H2AX está presente en el 2-25% de los nucleosomas en el genoma de mamíferos, dependiendo del organismo y tipo celular. La fosforilación de esta histona variante en la serina 139 es uno de los primeros eventos como respuesta a DSBs en el ADN. Este proceso de fosforilación de H2AX se considera, por lo tanto, como un jugador central en DDR (Moeglin y cols., 2019). Brevemente, lo que sucede es lo siguiente: la interacción entre RAD50 de MRN y los dominios BRCT de la proteína 53BP1 promueven el reclutamiento de complejos MRN en las DSBs, lo que conduce a la formación de monómeros activos (pSer1981) de ATM y esto a su vez promueve la propagación de modificaciones de histonas a distancias crecientes de las DSBs, generando la fosforilación de la histona variante H2AX en la serina 139 (identificada como γ H2AX o gH2AX, indistintamente); cabe señalar que el complejo MRN actúa como sensor significativo para las DSBs inducidas por agentes como IR (Shibata y Jeggo, 2018).

Una de las características que hacen al gen que codifica H2AX único entre los otros genes de histonas, es que contiene regiones de ambas especies de histonas: dependientes e independientes de duplicación; es con este mecanismo de regulación que se asegura la presencia suficiente de moléculas de H2AX en G0 y G1 del ciclo celular. Dentro de las principales técnicas que se utilizan para medir los niveles y la cinética de H2AX se encuentran inmunotinción, citometría de flujo, western blot y el

ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), los más utilizados son los dos primeros (Palla y cols., 2017).

La citometría de flujo es una metodología clave utilizada para evaluar la DDR en células individuales. Dentro de sus principales ventajas se puede mencionar que permite un análisis multiparamétrico y la detección rápida de la señal de gH2AX, que permite asociar eventos DDR particulares con estados funcionales en la célula (Palla y cols., 2017; Zhao y cols., 2017).

La gH2AX se forma en ambas vías de reparación: RH y NHEJ. Actualmente, está bien establecido que gH2AX recluta otros factores para facilitar los mecanismos de amplificación de señales en respuesta al daño por DSBs; cabe indicar que posterior al reclutamiento y activación de ATM, H2AX es uno de los primeros sustratos de esta proteína y es fosforilada en segundos (Georgoulis y cols., 2017).

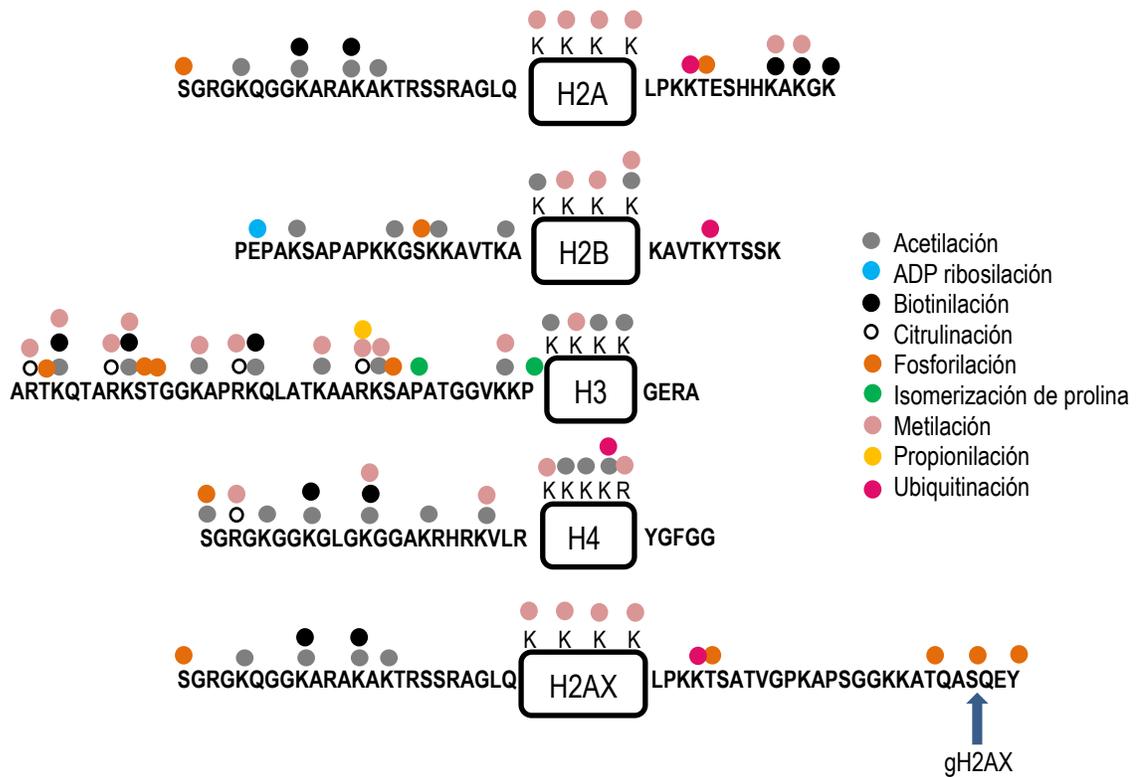


Figura 5. Modificaciones postraduccionales en histonas. Se muestran algunos ejemplos de los sitios donde ocurren modificaciones postraduccionales (MPTs) en las histonas centrales (H2A, H2B, H3, H4). En la sección central derecha, se indican las diferentes MPTs (acetilación, ADP ribosilación, biotinilación, citrulinación, fosforilación, isomerización de prolina, metilación, propionilación y ubiquitinación) que se distinguen fácilmente con círculos de colores diferentes. Algunos residuos pueden sufrir diversas formas de MPTs, idénticas o diferentes, incrementando la complejidad del código de histonas. Además de las histonas centrales, se muestra la histona variante H2AX, que difiere de H2A en la secuencia primaria de aminoácidos, con una cola COOH terminal única y más larga, donde se lleva a cabo su fosforilación en la Ser139 (Modificado de Redon y cols., 2012).

1.4.10 Guardián del genoma: proteína P53

Esta proteína es la principal responsable del mantenimiento de la homeostasis celular y la integridad del genoma, a través de su función como factor de transcripción lábil, por medio del control de la expresión de genes diana esenciales codificantes y no codificantes de proteínas. P53 se encuentra en el centro de varias vías fundamentales de señalización celular como la detención del ciclo celular, la apoptosis, la autofagia, el metabolismo celular y la reparación del ADN; por lo anterior, se le ha denominado “guardián del genoma”. Cabe indicar que estas actividades las realiza gracias a su interacción con el ADN y otras proteínas, incluidos los miembros de su familia como P63 y P73 (Engeland, 2018; Napoli y Flores, 2020; Sabapathy y Lane, 2019).

Si bien aún existe debate al respecto, se estima que P53 activa la transcripción de aproximadamente 500 genes diana; el número se eleva considerablemente cuando se habla de los genes diana indirectos, que pueden llegar a miles (Lieschke y cols., 2019). Cabe agregar, que es una proteína importante para la estabilidad de la red de interacción proteína-proteína en un organismo, permitiendo que funcione normalmente (Y. S. Tan y cols., 2019). P53 se estabiliza y se activa en respuesta a tensiones celulares como el daño al ADN y las señales hiperproliferativas, sin embargo, en condiciones celulares normales se mantiene a niveles bajos en la célula (Bowen y Attardi, 2019). Dentro de las características que se han tomado en cuenta para determinar la respuesta celular al activarse P53, se encuentran el tipo celular y los niveles de proteína (Lieschke y cols., 2019).

Previamente se ha demostrado que las actividades de P53 están estrictamente controladas por MDM2 (murine double minute 2), su principal regulador negativo; sin embargo, recientemente se ha observado que la proteína MDM4 (murine double minute 4) también puede modular su actividad, pues es responsable de incapacitar a P53 para permitir el crecimiento en condiciones normales y del mantenimiento de la viabilidad celular (Haupt y cols., 2019).

Estructuralmente, P53 contiene un dominio de transactivación en el extremo NH₂ terminal de forma nativa, que a su vez puede dividirse en dos subdominios; posteriormente en la región central se encuentra el DBD y más cercano a la región C-terminal, presenta el dominio de oligomerización (Figura 6) (Sabapathy y Lane, 2019). En la Figura 6, se muestran los sitios de fosforilación identificados hasta el momento en la proteína P53.

La fosforilación de la proteína P53 en la serina 15 dada por ATM, está involucrada en su activación y estabilidad (Ozaki y cols., 2015). Se piensa que la fosforilación de P53 se realiza en el nucleoplasma (Falck y cols., 2005). Esta proteína guardiana participa en las dos vías de reparación para las DSBs. Si bien en la vía de reparación NHEJ las funciones de P53 siguen siendo desconocidas en su mayoría, se sabe que minimiza la inestabilidad genómica causada por NHEJ de baja fidelidad. Por su parte, en la reparación por RH P53 puede regular la reparación de DSBs transcripcionalmente, a través de su interacción directa con RAD51 (Williams y Schumacher, 2016).

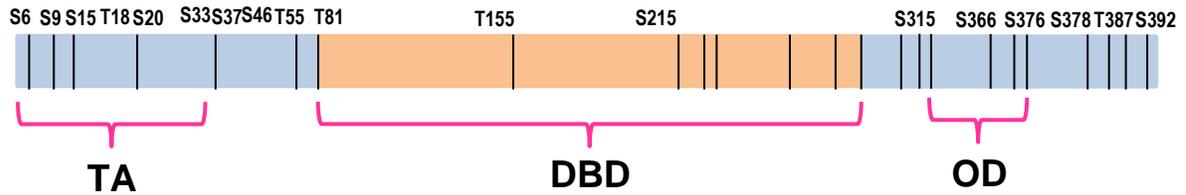


Figura 6. Sitios de fosforilación de P53. A partir del extremo amino terminal, inicia con el dominio de transactivación (TA), dentro del cual se encuentra la fosforilación es Ser15. Después, en la región central de esta proteína, se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD), y más cercano al extremo carboxilo terminal, el dominio de oligomerización (OD) (Modificado de Sabapathy y Lane, 2019).

Las MPTs dirigen la especificidad del interactoma P53, su estado intrínsecamente desordenado permite que pueda interactuar con más de 300 factores celulares para lograr esta multifuncionalidad. ATM controla la actividad de P53 a través de su fosforilación en Ser15 (Karakostis y cols., 2019).

1.4.11 Vía de reconocimiento del daño al ADN por rupturas de doble cadena

Para llevar a cabo el reconocimiento y respuesta adecuados ante la presencia de las DSBs, se requiere de una amplia variedad de MPTs. Posterior a la inducción de este tipo de lesiones, el complejo MRN, que participa como sensor, las detecta y promueve la monomerización, autofosforilación y activación de ATM (serina 1981, pATM). La proteína ATM es una cinasa homeostática con funciones en muchos circuitos celulares, que actúa como transductor principal en la vía de reconocimiento y respuesta en presencia de DSBs. ATM se encarga de fosforilar a la histona variante H2AX (serina 139), que participa como mediador en esta vía, para transformarla en gH2AX; así mismo, fosforila a la proteína P53, que actúa como efector. Cabe resaltar, que esta vía ha sido denominada canónica para el reconocimiento y reparación ante DSBs (Berger y cols., 2017; Gavish-Izakson y cols., 2018; Pateras y cols., 2015).

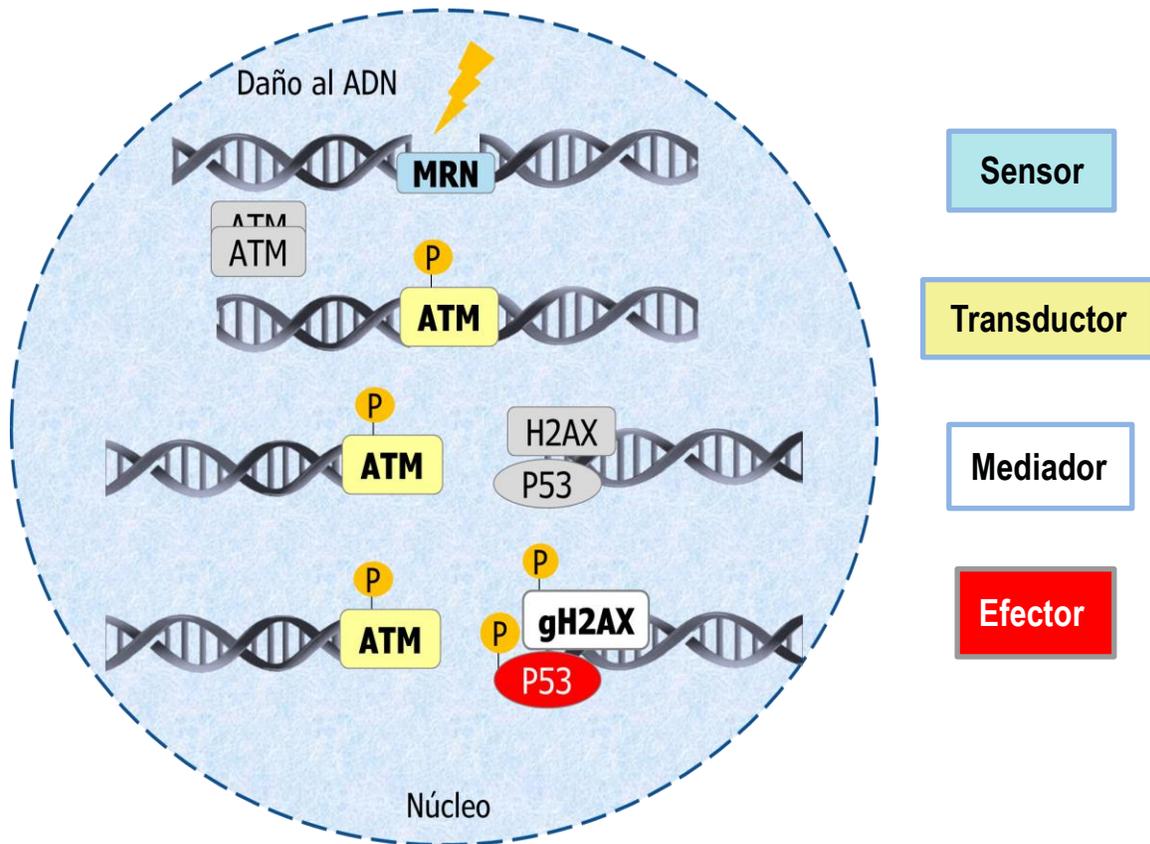


Figura 7. Vía canónica de reconocimiento del daño al ADN por rupturas de doble cadena. Se ilustra brevemente lo que sucede en la vía de señalización debido al daño por DSBs. El complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) que actúa como sensor, se encarga de detectar este tipo de lesiones y promover la monomerización, autofosforilación (serina 1981, pATM) y activación de la cinasa ATM, que participa como transductor. Al estar activa, ATM se encarga de fosforilar a la histona variante H2AX en la serina 139 (que actúa como mediador), para transformarla en gH2AX; también fosforila a la proteína P53, que participa como efector (Basado en Pateras y cols., 2015).

2. JUSTIFICACIÓN

La DCP continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial y nacional, ya que representa un desafío para la salud, el desarrollo y crecimiento adecuado. De ahí que actualmente la DCP es objeto de estudio a distintos niveles (bioquímico, inmunológico, conductual, celular y citogenético) ya que provoca múltiples alteraciones en los organismos que la padecen.

A nivel citogenético, se ha observado que la desnutrición genera intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, alta frecuencia de MNs y daño al ADN. Estos eventos pueden comprometer la adecuada formación, desarrollo y funcionalidad de células, tejidos, órganos y, por lo tanto, del organismo.

Si bien, estos estudios describen alteraciones a distintos niveles en las células, tejidos y órganos provenientes de humanos y modelos animales con desnutrición, el mecanismo exacto de cómo ocurren y las alteraciones particulares en las vías de señalización requieren atención para su estudio.

Lo anterior, sustenta la necesidad de generar conocimiento y contribuir con información que permita abrir camino y dilucidar de manera precisa, lo que está ocurriendo a este nivel. Por consiguiente, el propósito de esta investigación es realizar el estudio de la señalización que participa en el daño al ADN por DSBs generados por la desnutrición.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la DCP moderada y grave sobre gH2AX, pATM, P53t y P53-pSer15 (sin fosforilar y fosforilada en Ser15), que participan en el reconocimiento del daño al ADN por rupturas de doble cadena (DSBs) en linfocitos T y B de ratas lactantes?

4. HIPÓTESIS

Se ha observado que la DCP genera daño al material genético por DSBs, por lo tanto, observaremos alteraciones en el porcentaje de linfocitos T y B positivos a las proteínas gH2AX, pATM, P53t y P53-pSer15, que participan en el reconocimiento de este tipo de lesiones.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto derivado de la desnutrición moderada y grave sobre las proteínas gH2AX, pATM, P53t y P53-pSer15, que participan en la señalización del daño al ADN por DSBs, en linfocitos T y B de ratas lactantes.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el porcentaje de células viables por conteo en sangre periférica y bazo de ratas bien nutridas y con desnutrición experimental durante la lactancia de 2^o y 3^{er} grado.

- Cuantificar linfocitos de sangre periférica y bazo en las diferentes fases del ciclo celular, de ratas bien nutridas y con desnutrición experimental durante la lactancia de 2º y 3º grado, utilizando citometría de flujo.
- Analizar el porcentaje de linfocitos T y B gH2AX+/pATM+ en sangre periférica de ratas bien nutridas y con desnutrición experimental durante la lactancia de 2º y 3º grado, utilizando citometría de flujo.
- Analizar el porcentaje de linfocitos T y B gH2AX+/pATM+ en bazo de ratas bien nutridas y con desnutrición experimental durante la lactancia de 2º y 3º grado, mediante citometría de flujo.
- Analizar el porcentaje de linfocitos T y B P53t+/P53-pSer15+ en sangre periférica de ratas bien nutridas y con desnutrición experimental durante la lactancia de 2º y 3º grado, utilizando citometría de flujo.
- Analizar el porcentaje de linfocitos T y P53t+/P53-pSer15+ en bazo de ratas bien nutridas y con desnutrición experimental durante la lactancia de 2º y 3º grado, mediante citometría de flujo.
- Analizar el porcentaje positivo a las proteínas fosforiladas de acuerdo con el sexo en sangre periférica y bazo de ratas bien nutridas y con desnutrición experimental durante la lactancia de 2º y 3º grado.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

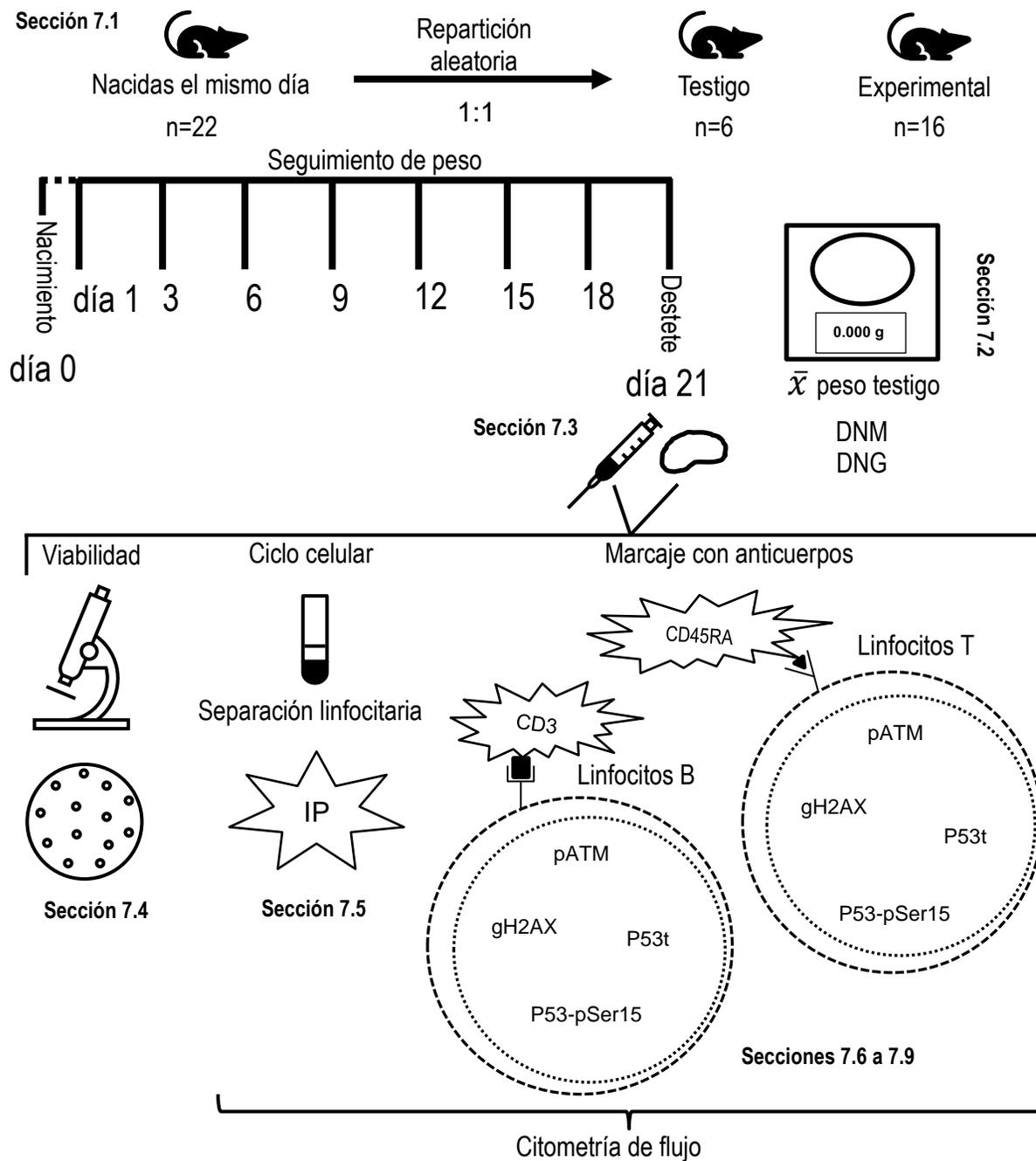


Figura 8. Planeación del trabajo experimental. Se ilustra cada uno de los pasos para la realización del presente trabajo, indicando a que sección pertenecen. DNM: desnutrición moderada; DNG: desnutrición grave; IP: yoduro de propidio. Anticuerpos CD3: linfocitos T; CD45RA: linfocitos B; pATM: ATM fosforilada en la serina 1981; gH2AX: histona variante H2AX fosforilada en la serina 139; P53t: P53 sin fosforilar; P53-pSer15: P53 fosforilada en la serina 15.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Desnutrición experimental

El presente trabajo se efectuó siguiendo las guías certificadas por la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, de acuerdo con las normas internacionales para el uso de ejemplares para experimentación.

Se emplearon ratas de la cepa Wistar, mantenidas en el bioterio de la UAM-I, bajo condiciones de ciclo luz-obscuridad L12/O12, temperatura de 22-25°C y humedad relativa de 45%. Las madres fueron criadas con alimento balanceado para roedores (Abene Bio-Dieta-Lab BDL-7100 con 23% de proteína), y se les proporcionó agua filtrada *ad libitum*.

La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante la lactancia, aumentando el número de crías por madre; este método se basa en la disminución de la cantidad de leche por cría (Ortiz y cols., 1996).

Se repartieron aleatoriamente a las crías al día siguiente de su nacimiento (al que se denomina día 1), en 2 lotes: Bien nutridas (BN, lote testigo), con 6 crías y Desnutridas (DN, lote experimental) con 16 crías, conservando la relación hembra-macho 1:1.

7.2 Grado de desnutrición

Los valores referentes al peso corporal de las ratas DN y BN se obtuvieron desde el día 1 hasta el día 21 (destete), pesando las crías cada tercer día durante el

experimento; los valores registrados se utilizaron para realizar el cálculo del déficit de peso de cada animal. Este se calculó comparando el peso de cada ejemplar del grupo experimental con el promedio del peso de las ratas pertenecientes al lote testigo de la misma edad, para establecer el grado de desnutrición. En el presente trabajo se utilizaron ratas de 2º (DNM) y 3º grado (DNG).

7.3 Extracción de sangre y bazo

Las ratas de 21 días de edad se sacrificaron por dislocación cervical. Utilizando jeringas previamente heparinizadas, se colocaron en posición dorsal, limpiando el área sobre el corazón con un desinfectante y palpando el lugar donde el latido es más fuerte. A continuación, se introdujo la aguja en el segundo o tercer espacio intercostal del lado izquierdo.

Posteriormente, se realizó una incisión abdominal para obtener el bazo, que se encuentra también del lado izquierdo, debajo del hígado.

7.4 Viabilidad celular

Esta prueba se basa en el principio de que las células vivas tienen membranas celulares intactas, de tal manera que excluyen ciertos colorantes como el yoduro de propidio (IP) y el azul tripano.

Para determinar la viabilidad de los linfocitos se utilizó azul tripano al 0.4% y cámara de Neubauer para contar las células. El azul tripano ingresa al citoplasma de

las células cuando están dañadas y se observan teñidas; por su parte las células vivas se observan con el citoplasma sin teñir (transparentes).

El porcentaje de células viables se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{células incoloras}}{\text{células totales}} (100)$$

7.5 Ciclo celular

Con la intención de asegurar que las células con las que trabajamos no están ciclando, realizamos esta prueba. Se utilizó el contenido de ADN como marcador, basado en la fluorescencia del IP.

Para iniciar, en ambos tejidos se realizó la separación de linfocitos utilizando Lymphoprep®, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez que se tienen las células en suspensión, se centrifugan a 500 g por 5 min., se añaden 2 ml de PBS, se repite la centrifugación y se retira el sobrenadante. Después, se agregan 200 µl de PBS y las células se gotean en un tubo que contiene alcohol al 70% frío, en constante agitación (utilizando vórtex). Se deja reposar 10 min. a 4 °C.

Posteriormente, se centrifugan las muestras a la misma velocidad, ahora por 10 min., se retira el sobrenadante y se resuspende el paquete celular en 1.5 ml de PBS. Se centrifugan las muestras, esta vez durante 5 min., se retira sobrenadante y se añaden 500 µl de PBS. Luego, las células se incuban con 50 µl de RNAsa

(1mg/ml) durante 30 min. a temperatura ambiente. Si después de este paso, se observan aglomerados de restos celulares, las muestras deben filtrarse.

A continuación, se agregan 250 µl de PAF al 1% y se añade IP para una concentración final de 5 µg/ml.

7.6 Marcaje de linfocitos T y B en sangre

1.- Una vez obtenida la sangre de los ejemplares, se toman 130 µl de la muestra, añadiendo 2 µl de anticuerpos CD3 APC y CD45RA PE, para distinguir linfocitos T y B respectivamente. Se mezcla suavemente con ayuda de un agitador tipo vórtex y se deja incubar 30 min. en oscuridad y frío (4 °C).

2.- Se añaden 2 ml de solución de lisis y se deja reposar 10 min., posteriormente se realiza lavado con PBS. Este paso se repitió las veces necesarias (aprox. 3) hasta que la muestra pierde la coloración roja.

3.- Posteriormente se adicionan 500 µl de solución de permeabilización 1X (BD FACS Permeabilizing Solution 2 ®), se mezcla con vórtex y se deja incubar por 10 min.

7.7 Marcaje de linfocitos T y B en bazo

1.- El bazo se coloca en una caja de Petri con PBS y se homogeneiza con la ayuda de un pistilo de vidrio en un colador pequeño.

2.- Las células se resuspenden en PBS y se centrifugan a 1300 rpm durante 5 min. Se elimina el sobrenadante, se filtra con 3 ml de PBS, y se repite la etapa de centrifugación.

3.-Se desecha el sobrenadante y las células se resuspenden en 1 ml de PBS. De la muestra resultante, se mezclan 100 µl con 2 µl del anticuerpo CD3 APC y CD45RA PE y se incuban durante 30 minutos en oscuridad y frío. A continuación, se sigue el procedimiento de permeabilización de la sangre mencionado anteriormente.

4.- Se adiciona 1 ml de solución al 1% de albúmina sérica de bovino en PBS para centrifugar a 1300 rpm durante 5 min., desechando el sobrenadante.

7.8 Marcaje de gamma H2AX y ATM fosforilada en Ser 1981

Se agregan los anticuerpos para gH2AX y pATM siguiendo las indicaciones del fabricante; a continuación, se añade 1 ml de solución al 1% de albúmina-PBS para centrifugar y retirar sobrenadante. El paquete celular se resuspende en 500 µl de PBS y se fija en 500 µl de paraformaldehído (PAF) al 1%, refrigerándolo a 4°C de 2-24 hrs.

7.9 Marcaje de P53 sin fosforilar y fosforilada en Ser 15

Se adiciona anti-p53 sin fosforilar y el anticuerpo primario para p53 fosforilada en serina 15 de acuerdo con las indicaciones del proveedor. El siguiente paso es

adicionar 1 ml de solución al 1% de albúmina-PBS, centrifugar y retirar sobrenadante. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario para p53 fosforilada en serina 15 FITC, mezclando suavemente, dejando reposar en frío y oscuridad durante 30 min. Se realiza otro lavado y los paquetes celulares se sitúan en 500 μ l de PBS, se fijan con 500 μ l de PAF al 1% y se refrigeran hasta su adquisición.

7.10 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se empleó el citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson®) con un láser azul de argón (488 nm), un láser de diodo rojo (635 nm), y el paquete computacional CellQuest (versión 6.1, BD®) para la adquisición de los datos. Se adquirieron 2×10^4 células, desplegando gráficas de punto (*dot plot*). Para analizar los datos obtenidos, se ocupó el programa Flowing Software 2, detectando las fluorescencias en los diferentes canales como indica el Cuadro 1.

| Detectores | | | |
|-------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| FL1 Verde | FL2 Amarillo | FL3 Naranja-Rojo | FL4 Rojo lejano |
| gamma-H2AX FITC | CD45RA PE | ATM (pSer1981) PerCP | CD3 APC |
| p53 (pSer15) FITC | CD45RA PE | p53 PerCP | CD3 APC |

Cuadro 1. Detectores para cada fluorescencia. En FL1 se detecta la fluorescencia verde, en FL2 amarilla, en FL3 naranja-rojo y en FL4 rojo lejano.

7.10.1 Selección de la región de análisis

La primera gráfica se realizó con CD45RA contra complejidad interna, dada por la dispersión lateral de la luz (Side Scatter, SSC) para establecer la región de células por analizar (Figura 9 letra A).

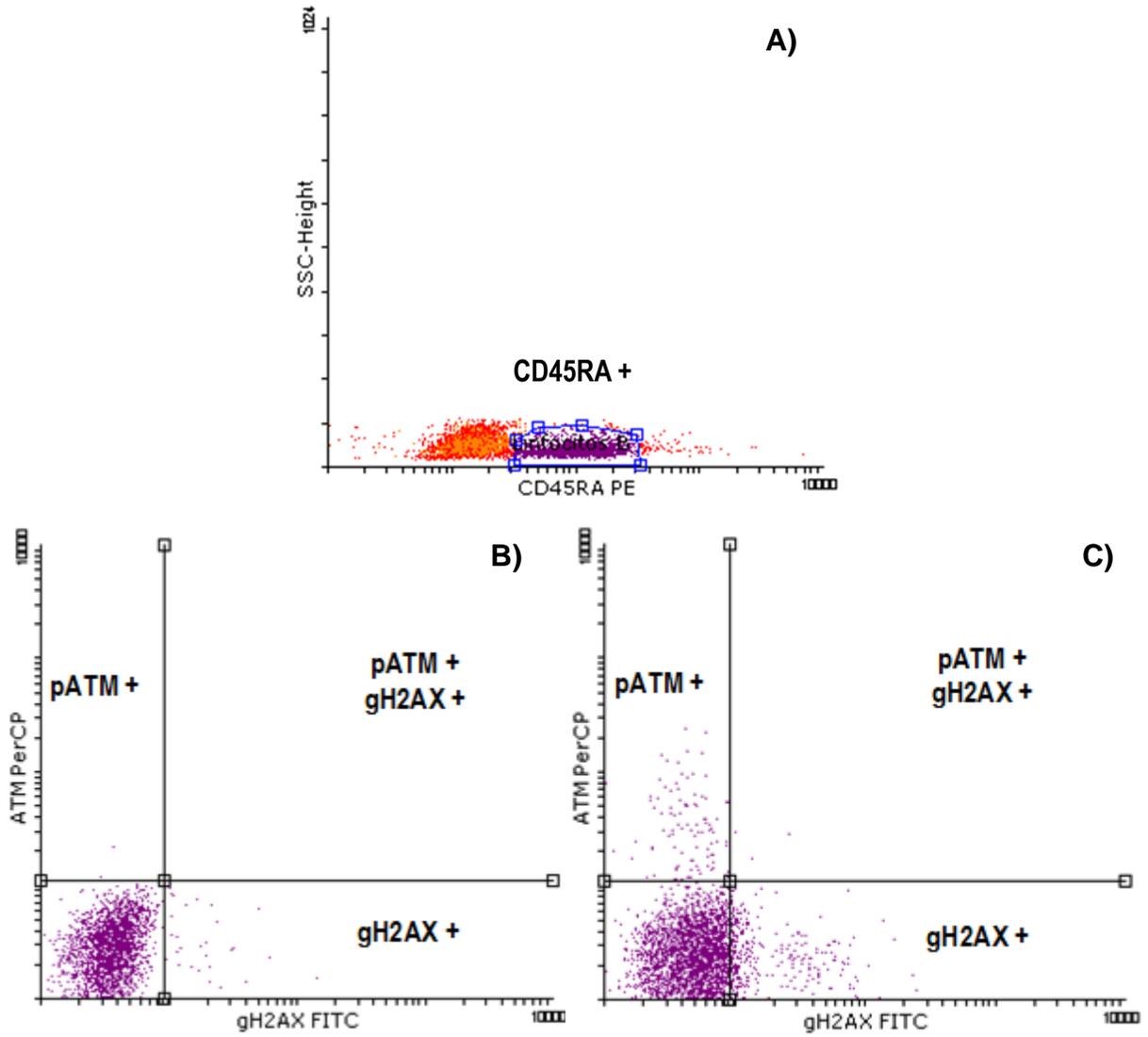


Figura 9. Estrategia de análisis pATM y gH2AX. Se muestran las gráficas de puntos (*dot plot*). A: muestra de sangre periférica de una rata BN en la que se enmarca la región para el análisis de las células de interés (linfocitos B, CD45RA+); B: muestra de sangre periférica de una rata BN, que indica la integración del cuadrante para establecer la región de corte; C: muestra de sangre periférica de una rata DN. Región superior derecha, células dobles-positivas pATM+/gH2AX+; región inferior derecha, células positivas a la histona H2AX fosforilada en la serina 139 (gH2AX+); y células de la región superior izquierda positivas para ATM fosforilada en la serina 1981 (pATM+).

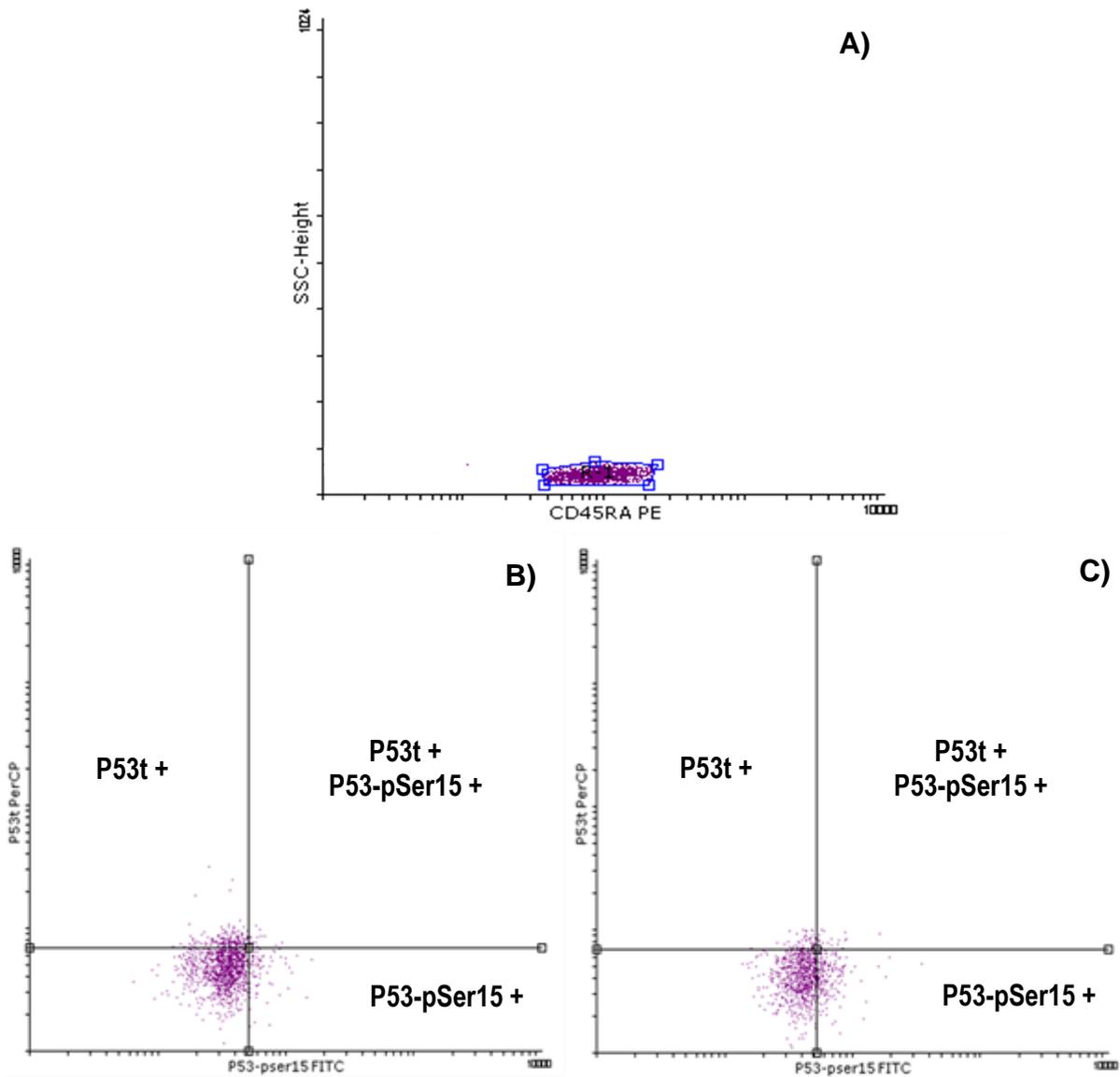


Figura 10. Estrategia de análisis P53 sin fosforilar y fosforilada en Ser 15. Se muestran las gráficas de puntos (*dot plot*). A: muestra de sangre periférica de una rata BN en la que se enmarca la región para el análisis de las células de interés (linfocitos B, CD45RA+); B: muestra de sangre periférica de una rata BN, que indica la integración del cuadrante para establecer la región de corte; C: muestra de sangre periférica de una rata DN. Región superior derecha, células dobles-positivas P53t+/P53-pSer15+; región inferior derecha, células positivas a P53 fosforilada en la serina 15 (P53-pSer15+); y células de la región superior izquierda positivas para P53 sin fosforilar (P53t+).

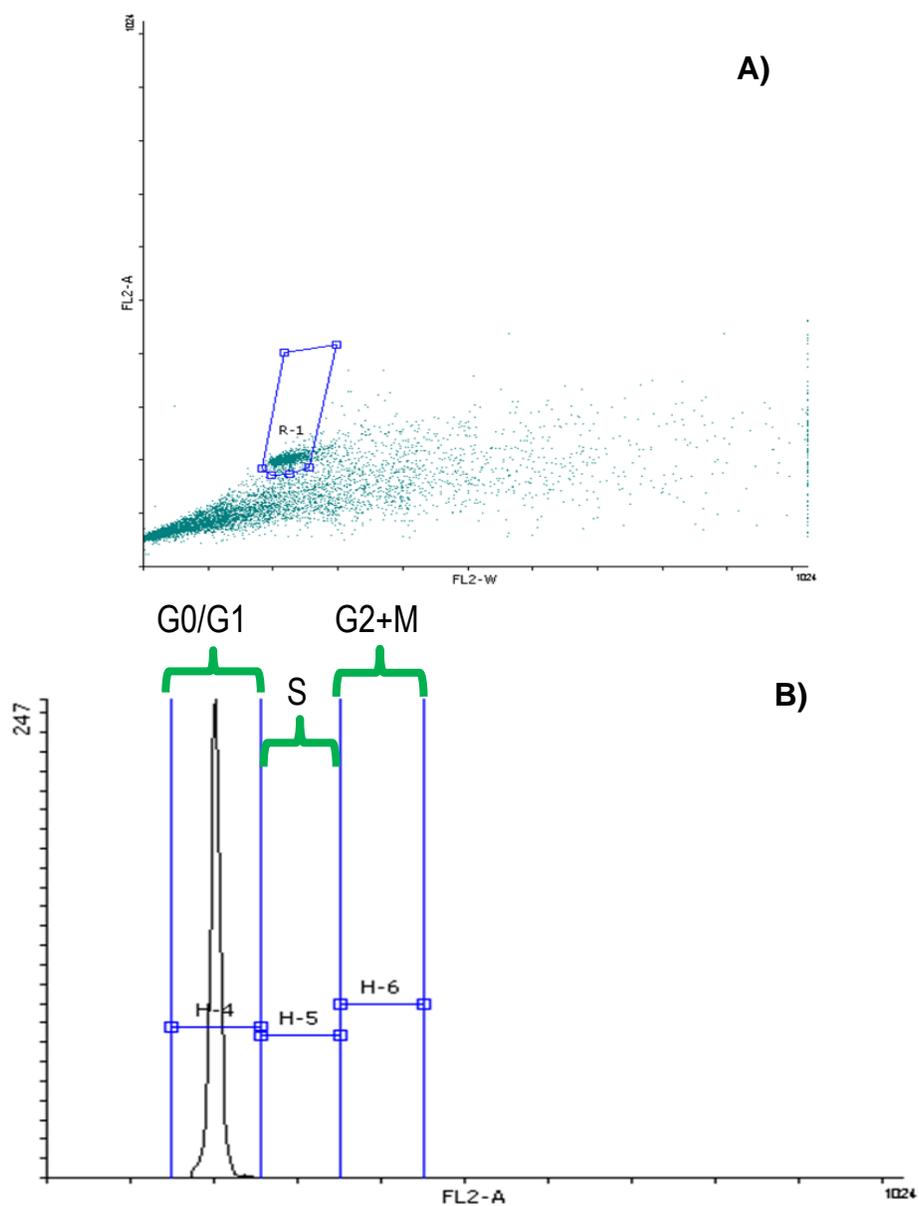


Figura 11. Estrategia de análisis para ciclo celular. A: Se presenta la gráfica de puntos (*dot plot*) de una muestra de sangre periférica de una rata BN, en la que se grafica FL2-W, para eliminar agregados en el eje X y FL2-A en el eje Y, que se refiere a la cantidad de ADN. Se enmarca la región para el análisis de las células de interés (linfocitos); B: Se presenta un histograma de una muestra de sangre periférica de una rata BN, que indica la delimitación por secciones de las regiones específicas

para cada fase del ciclo celular. De izquierda a derecha la primera región comprende las fases G0/G1, en el centro la fase S, y del lado derecho las fases G2+M.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los pesos corporales y del bazo se expresan como el promedio \pm desviación estándar (D.E.) obtenida para siete ratas en el grupo BN, ocho ratas en el grupo experimental DNM y nueve ratas en el grupo DNG. Las comparaciones entre los grupos se realizaron utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en conjunto con la prueba de comparación múltiple de Dunn, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. Así mismo, se realizaron las comparaciones por sexo mediante el análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Šídák; el software GraphPad Prism® versión 6.0 para Windows® fue utilizado para realizar todas las pruebas estadísticas mencionadas. Los valores de $P < 0.05$ indicaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

9. RESULTADOS

9.1 Desnutrición experimental

El procedimiento para inducir la desnutrición experimental durante la lactancia con respecto al aumento del peso corporal el día 21 (destete), indica que los animales de los grupos DNM y DNG pesaron significativamente menos que los del grupo BN. El peso promedio de las ratas BN fue de 51.11 ± 5.33 ; el de las ratas DNM

de 32.85 ± 4.15 y las ratas con DNG presentaron un promedio de 26.05 ± 1.68 ; lo anterior, indica un déficit promedio de 36.38 ± 3.25 en ratas con DNM, con un intervalo de 31.31 a 39.50 %; en el caso de DNG, el déficit promedio fue de 45.33 ± 2.83 , con un intervalo de 41.10 a 51.20 % (indicado en la Tabla I). Estas cifras muestran que el método utilizado para inducir desnutrición permite obtener ratas con diferentes grados.

La información referente al peso del bazo se presenta en la Tabla 1; el bajo peso del bazo se correlacionó con el grado de desnutrición, dado que el peso más bajo de este órgano se encontró en ratas del grupo DNG (0.08 g en promedio), seguido de ratas del grupo DNM (promedio, 0.15 g), ambos valores estadísticamente significativos.

Es importante indicar que al momento de formar las camadas BN (testigo) y DN (experimental), el peso de las ratas no mostró diferencias significativas, contando con un día de nacimiento.

Tabla 1. Peso corporal y del bazo de ratas BN y ratas con desnutrición moderada (DNM) y grave (DNG). Promedio \pm D.E. Diferencias significativas: (P < 0.05) * vs BN y ** vs DNG. (P < 0.0001) ^ vs BN.

| | Peso corporal (g) BN | Bazo (g) | Peso corporal (g) DNM | % Déficit | Bazo (g) | Peso corporal (g) DNG | % Déficit | Bazo (g) |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------|------------------|-----------------|
| | 46.10 | 0.36 | 27.60 | 39.50 | 0.09 | 25.20 | 44.80 | 0.07 |
| | 44.70 | 0.44 | 30.90 | 32.30 | 0.16 | 25.10 | 45.00 | 0.08 |
| | 45.10 | 0.35 | 27.70 | 39.30 | 0.15 | 26.90 | 41.10 | 0.09 |
| | 46.70 | 0.49 | 27.60 | 39.50 | 0.19 | 25.70 | 43.70 | 0.09 |
| | 58.80 | 0.38 | 38.90 | 34.27 | 0.19 | 24.00 | 47.40 | 0.05 |
| | 56.50 | 0.35 | 35.90 | 39.33 | 0.17 | 25.30 | 44.60 | 0.08 |
| | 54.50 | 0.24 | 34.40 | 36.41 | 0.16 | 29.80 | 44.91 | 0.12 |
| | 55.50 | 0.43 | 33.10 | 38.81 | 0.13 | 26.40 | 51.20 | 0.08 |
| | 52.10 | 0.37 | 38.20 | 31.31 | 0.17 | | | |
| | | | 34.20 | 33.07 | 0.17 | | | |
| Promedio | 51.11 | 0.37 | 32.85* | 36.38** | 0.15* | 26.05^ | 45.33 | 0.08^ |
| D.E. | 5.33 | 0.06 | 4.15 | 3.25 | 0.02 | 1.68 | 2.83 | 0.01 |

El déficit de peso en los bazos de ratas pertenecientes al grupo con desnutrición moderada (DNM), fue de 58.29 ± 7.63 y el déficit correspondiente para el grupo con desnutrición grave (DNG) fue de 78.22 ± 5.05 , comparados con el grupo testigo BN. Por su parte, la relación existente entre el peso del bazo con el peso corporal en las ratas del grupo BN presentó un valor de 7.61 ± 1.79 , el de las ratas con DNM de 4.95 ± 0.86 y las ratas con DNG presentaron un valor de 3.39 ± 0.46 . Las diferencias significativas se encontraron en ambos grupos con desnutrición, el

grupo DNM comparado con el DNG, y el grupo DNG comparado con el grupo testigo BN. Estos datos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Déficit de peso del bazo y la relación existente entre el peso del bazo con el peso corporal de ratas BN y ratas con desnutrición moderada (DNM) y grave (DNG). Promedio \pm D.E. Diferencias significativas: (P< 0.05) * vs BN y ** vs DNG. (P< 0.0001): ^ vs BN.

| | BN | DNM | DNG |
|---|-----------------|-------------------|------------------------------|
| Peso del bazo (g) | 0.37 \pm 0.06 | 0.15* \pm 0.02 | 0.08 [^] \pm 0.01 |
| % Déficit peso del bazo | --- | 58.29 \pm 7.63 | 78.22 \pm 5.05 |
| Relación peso del bazo (mg)/ peso corporal (g) | 7.61 \pm 1.79 | 4.95** \pm 0.86 | 3.39 [^] \pm 0.46 |

9.2 Porcentaje de células viables

El mayor porcentaje de células viables lo presentó el grupo testigo BN, en sangre y bazo, con valores de 98.46 \pm 0.37 y 98.43 \pm 0.40, respectivamente; por su parte, en el grupo con desnutrición DNM el porcentaje fue de 90.38 \pm 0.39 en sangre, y de 90.58 \pm 0.61 en bazo. Por otro lado, el porcentaje de células viables en el grupo DNG fue de 90.60 \pm 0.38 en sangre y de 90.51 \pm 0.42 en bazo. Esta información se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje celular viable en sangre periférica y bazo de ratas BN y ratas con desnutrición moderada (DNM) y grave (DNG). Promedio \pm D.E.

| | BN | DNM | DNG | |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| % células viables | 98.46 \pm 0.37 | 90.38 \pm 0.39 | 90.60 \pm 0.38 | Sangre periférica |
| | 98.43 \pm 0.40 | 90.58 \pm 0.61 | 90.51 \pm 0.42 | Bazo |

9.3 Citometría de Flujo

9.3.1 Porcentaje celular en las fases del ciclo celular

El porcentaje de linfocitos separados de sangre periférica en el grupo testigo BN, así como en el grupo con desnutrición DNM fue del 100% en las fases G0/G1. Por su parte, el porcentaje de linfocitos en las fases G0/G1 del grupo DNG fue de 99.75 \pm 0.28, y de 0.24 \pm 0.28 en la fase S, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de linfocitos de sangre periférica en las fases del ciclo celular de ratas BN y ratas con desnutrición moderada (DNM) y grave (DNG). Promedio \pm D.E.

| | BN | DNM | DNG |
|--------------|-------------|-------------|------------------|
| G0/G1 | 100 \pm 0 | 100 \pm 0 | 99.75 \pm 0.28 |
| S | --- | --- | 0.24 \pm 0.28 |
| G2/M | --- | --- | --- |

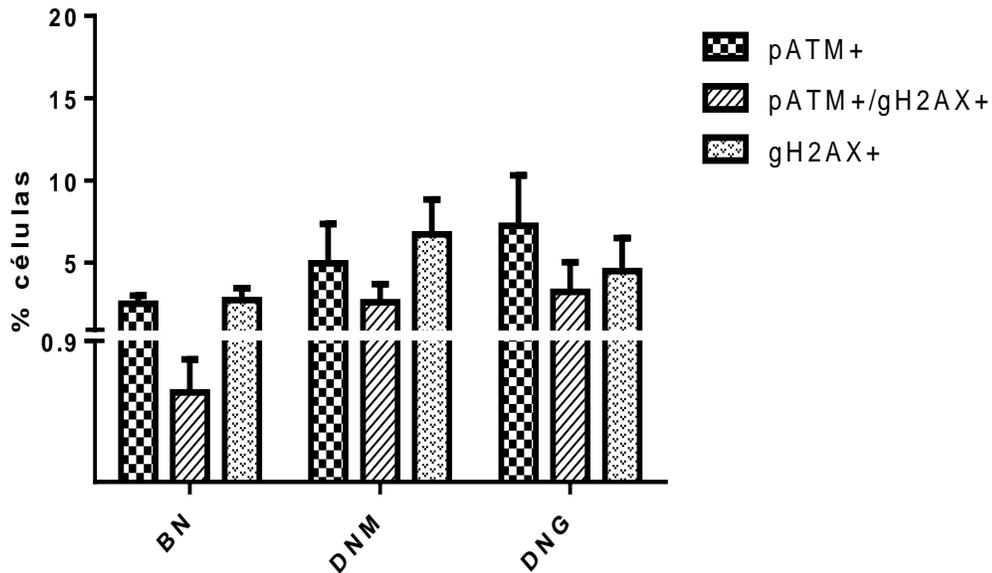
Así mismo, el porcentaje de linfocitos de bazo en el grupo BN, y en ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG) fue del 100% en las fases G0/G1, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de linfocitos de bazo en las fases del ciclo celular de ratas BN y ratas con desnutrición moderada (DNM) y grave (DNG). Promedio \pm D.E.

| | BN | DNM | DNG |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| G0/G1 | 100 \pm 0 | 100 \pm 0 | 100 \pm 0 |
| S | --- | --- | --- |
| G2/M | --- | --- | --- |

9.3.2 Porcentaje celular pATM/gH2AX en sangre

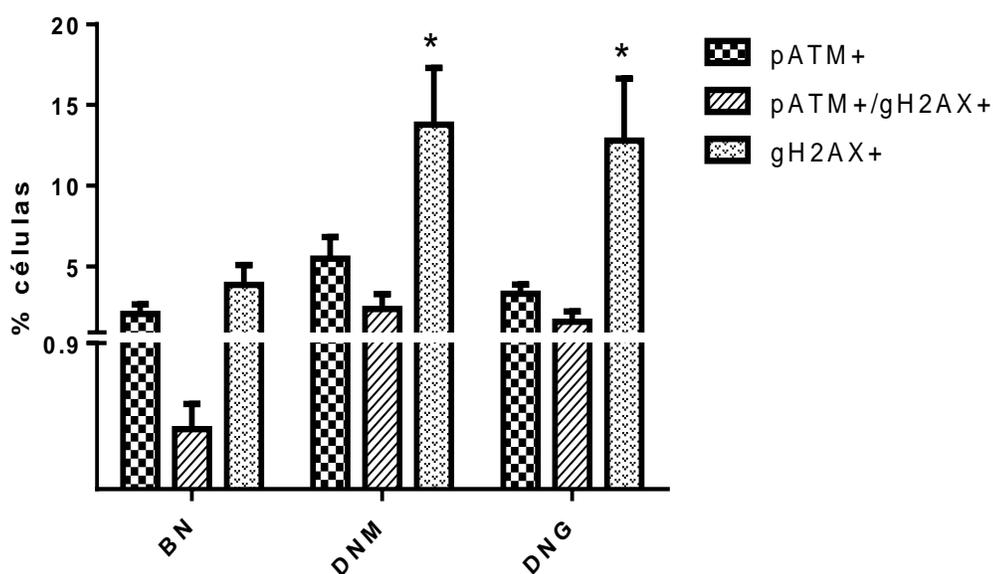
Aunque los porcentajes de linfocitos T pATM+ en sangre periférica de ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) mostraron una tendencia al incremento comparados con el grupo testigo, las diferencias no fueron significativas (como se indica en la Gráfica 1); se observaron hallazgos similares para los porcentajes de linfocitos T dobles positivos (pATM+/gH2AX+) y gH2AX+. Estos datos se muestran en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Linfocitos T en sangre pATM/gH2AX. Porcentajes de linfocitos T en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por citometría de flujo.

Aun cuando se observó una tendencia al incremento en los porcentajes de linfocitos B pATM+ y dobles positivos (pATM+/gH2AX+) en sangre periférica de

ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) en comparación con el grupo testigo, las diferencias no fueron significativas. Por otro lado, los porcentajes de linfocitos B gH2AX+ en sangre periférica de ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) fueron significativamente mayores que en el grupo BN, con incrementos de 3.5 y 3.3 veces, respectivamente. Esta información se indica en la Gráfica 2.

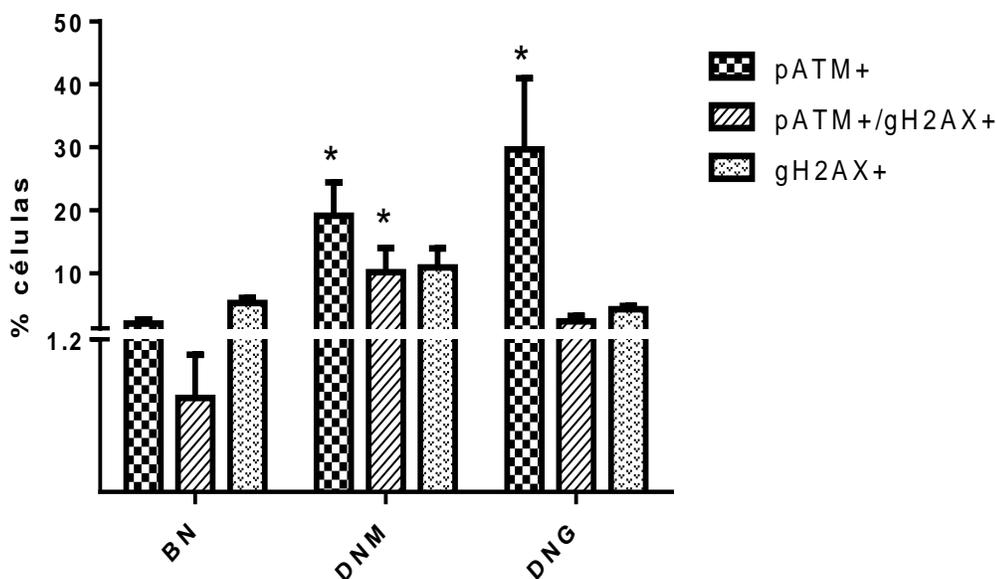


Gráfica 2. Linfocitos B en sangre pATM/gH2AX. Porcentajes de linfocitos B en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por citometría de flujo. ($P \leq 0.05$) indica diferencias significativas: * vs BN.

9.3.3 Porcentaje celular pATM/gH2AX en bazo

El porcentaje de linfocitos T pATM+ esplénicos en el grupo DNM fue significativamente mayor (9.6 veces) que en el grupo BN; un aumento similar en el porcentaje de células T dobles positivas (pATM+/gH2AX+) se observó en el grupo

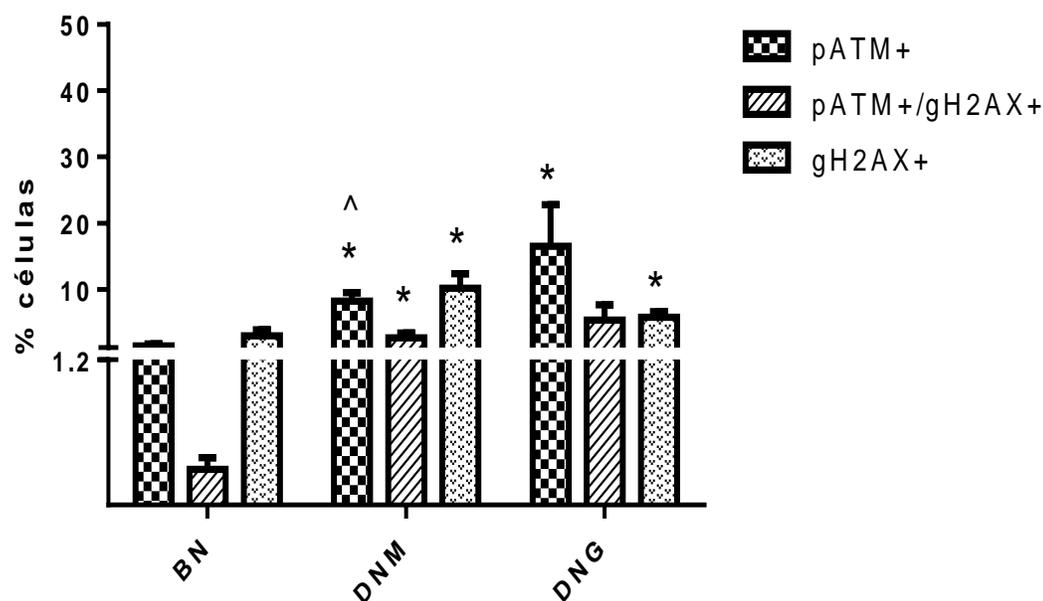
DNM, que se incrementó significativamente 13.6 veces en comparación con el grupo testigo. Se observó un aumento similar en el porcentaje de células T pATM+ en el grupo DNG (14.9 veces) en comparación con el grupo testigo, como se indica en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Linfocitos T esplénicos pATM/gH2AX. Porcentajes de linfocitos T esplénicos en el grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por citometría de flujo. ($P \leq 0.05$) indica diferencias significativas: * vs BN.

El porcentaje de linfocitos B pATM+ esplénicos en el grupo DNM aumentó significativamente 5.5 veces en comparación con el del grupo testigo. También se observó un aumento similar en el porcentaje de células B dobles positivas (pATM+/gH2AX+) en el grupo DNM mostrando un aumento estadísticamente significativo de 9.2 veces en comparación con el grupo BN; se observó un aumento similar en el porcentaje de linfocitos B gH2AX+ en el grupo DNM (3.3 veces en

comparación con el grupo BN). Además, el grupo DNG mostró un aumento significativo (11.1 veces) en el porcentaje de células B pATM+, y un aumento de 1.9 veces en las células B gH2AX+ en comparación con el del grupo BN. Estos datos se muestran en la Gráfica 4.

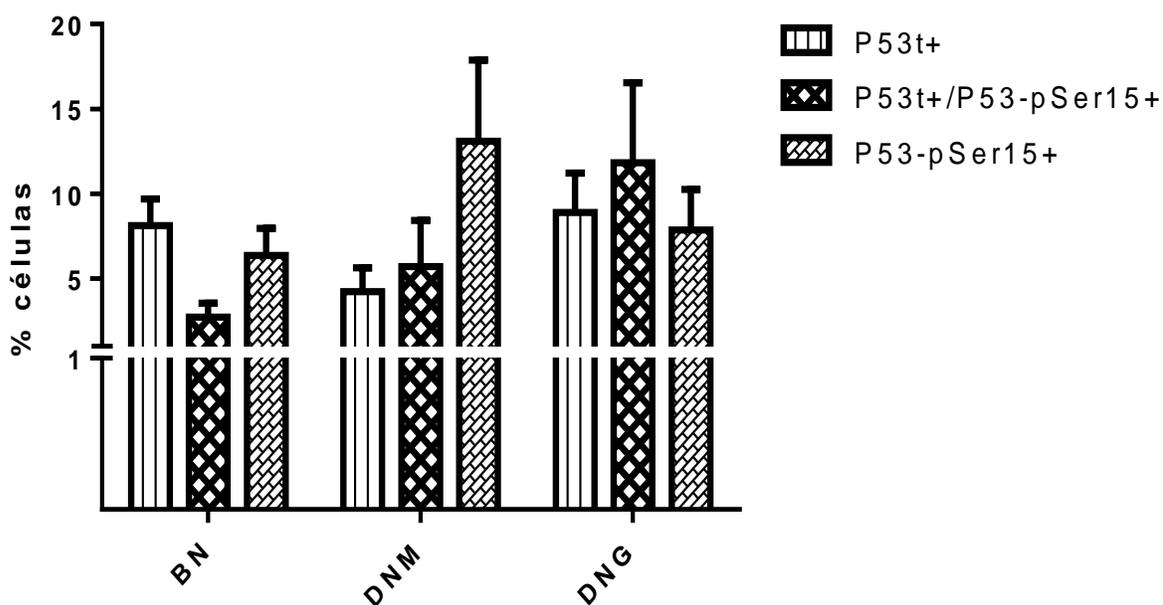


Gráfica 4. Linfocitos B esplénicos pATM/gH2AX. Porcentajes de linfocitos B esplénicos en el grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por citometría de flujo. ($P \leq 0.05$) indica diferencias significativas: * vs BN. ($P < 0.0001$): ^ vs BN.

9.3.4 Porcentaje celular P53 en sangre

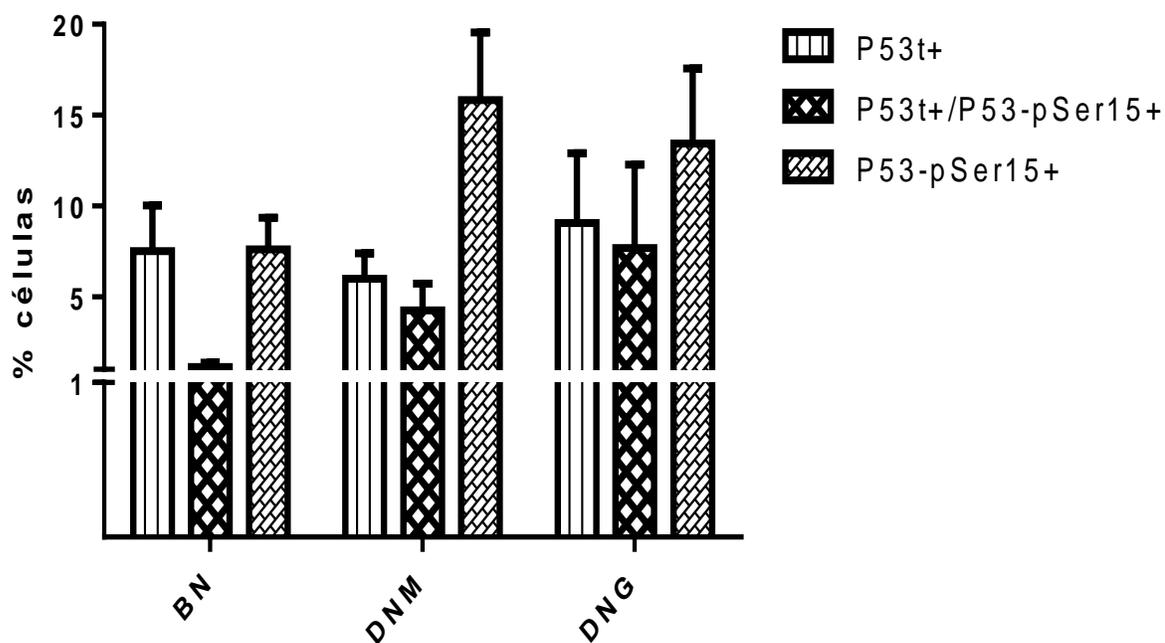
El porcentaje de linfocitos T P53t+ de sangre periférica mostró una tendencia a disminuir en el grupo DNM, y a incrementar en el grupo DNG, en comparación con el grupo testigo. Por su parte, se observó una tendencia al incremento en los

porcentajes de células T dobles positivas (P53t+/P53-pSer15+) en ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) comparados con el grupo testigo BN. Algo similar se observó en los porcentajes de linfocitos T P53-pSer15+, donde ambos grupos desnutridos, DNM y DNG, mostraron una tendencia al incremento en comparación al grupo testigo; sin embargo, ninguno de estos resultados fue estadísticamente significativo. Esta información se muestra en la Gráfica 5.



Gráfica 5. Linfocitos T en sangre P53t/P53-pSer15. Porcentajes de linfocitos T en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=6), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por citometría de flujo.

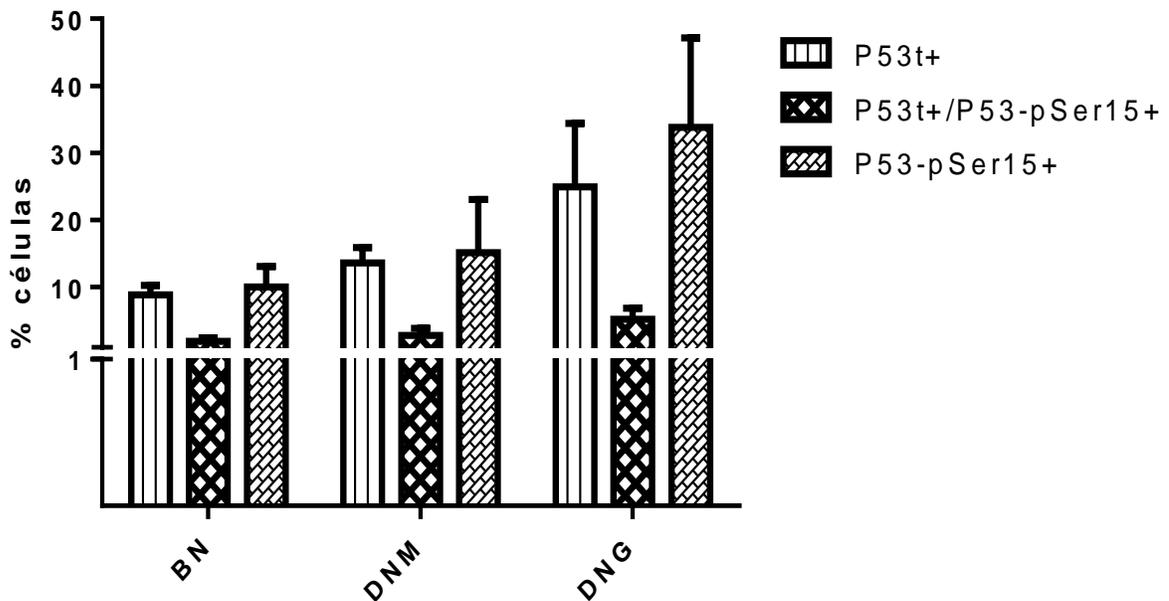
El porcentaje de linfocitos B P53t+ en sangre periférica mostró una tendencia a disminuir en el grupo con DNM, y a incrementar en el grupo con DNG, en comparación con el grupo testigo. En el caso de los porcentajes de células B dobles positivas (P53t+/P53-pSer15+) de ambos grupos con desnutrición, DNM y DNG, mostraron una tendencia al incremento con respecto al grupo testigo BN. Por su parte, los porcentajes de linfocitos B P53-pSer15+ en ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG), mostraron una tendencia al incremento en comparación con el grupo BN; estos resultados no fueron estadísticamente significativos, y se muestran en la Gráfica 6.



Gráfica 6. Linfocitos B en sangre P53t/P53-pSer15. Porcentajes de linfocitos T en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=6), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por citometría de flujo.

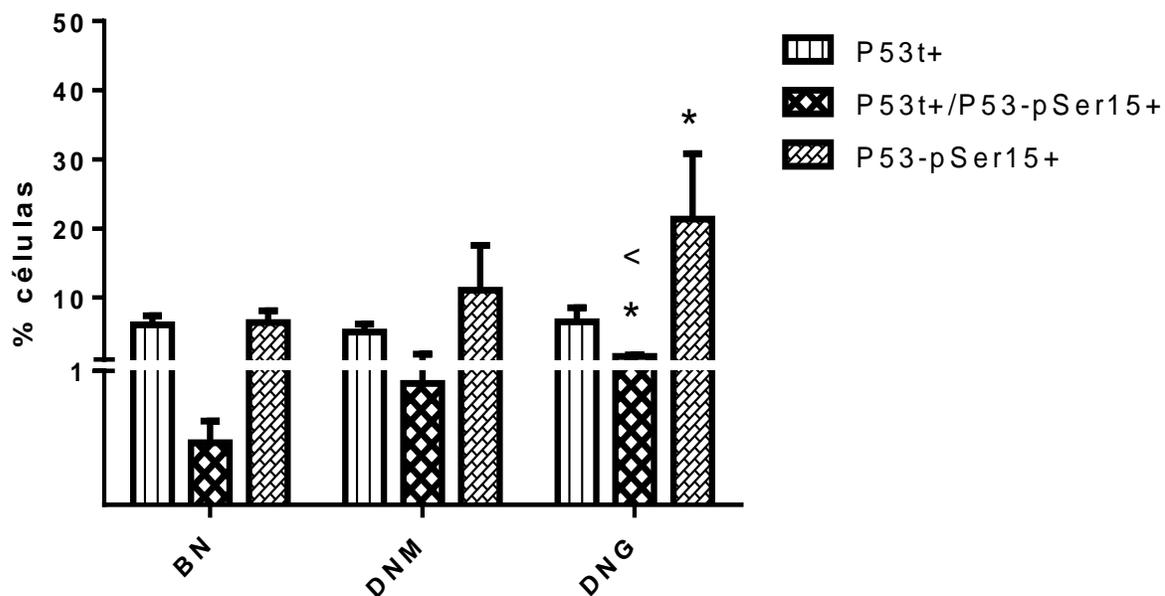
9.3.5 Porcentaje celular P53 en bazo

Los porcentajes de linfocitos T P53t+ en bazo de ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG) mostraron una tendencia al incremento en comparación con el grupo testigo. De manera similar, los porcentajes de células B dobles positivas (P53t+/P53-pSer15+) en ambos grupos con desnutrición, DNM y DNG, mostraron una tendencia al incremento comparados con el grupo testigo. En el caso del porcentaje de linfocitos T P53-pSer15+, ambos grupos con desnutrición, DNM y DNG, mostraron una tendencia al incremento con respecto al grupo BN; sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Esta información se muestra en la Gráfica 7.



Gráfica 7. Linfocitos T en bazo P53t/P53-pSer15. Porcentajes de linfocitos T en muestras de bazo del grupo testigo (BN, n=6), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por citometría de flujo.

Se observaron porcentajes de linfocitos B P53t+ en bazo de ambos grupos desnutridos, DNM y DNG, muy cercanos al grupo testigo BN. En el caso del porcentaje de células B dobles positivas (P53t+/P53-pSer15+), el grupo DNM muestra un porcentaje similar al del grupo BN y el grupo con DNG un aumento de 3.2 veces comparado con el grupo BN y de 1.6 veces, comparado con el grupo DNM; este aumento comparado con ambos grupos (BN y DNM) fue estadísticamente significativo. Por su parte, el porcentaje de linfocitos B P53-pSer15+ en el grupo DNM mostró una tendencia al incremento, sin embargo, el único aumento estadísticamente significativo, de 3.3 veces, se observó en el grupo DNG comparado con el BN. Estos resultados se muestran en la Gráfica 8.

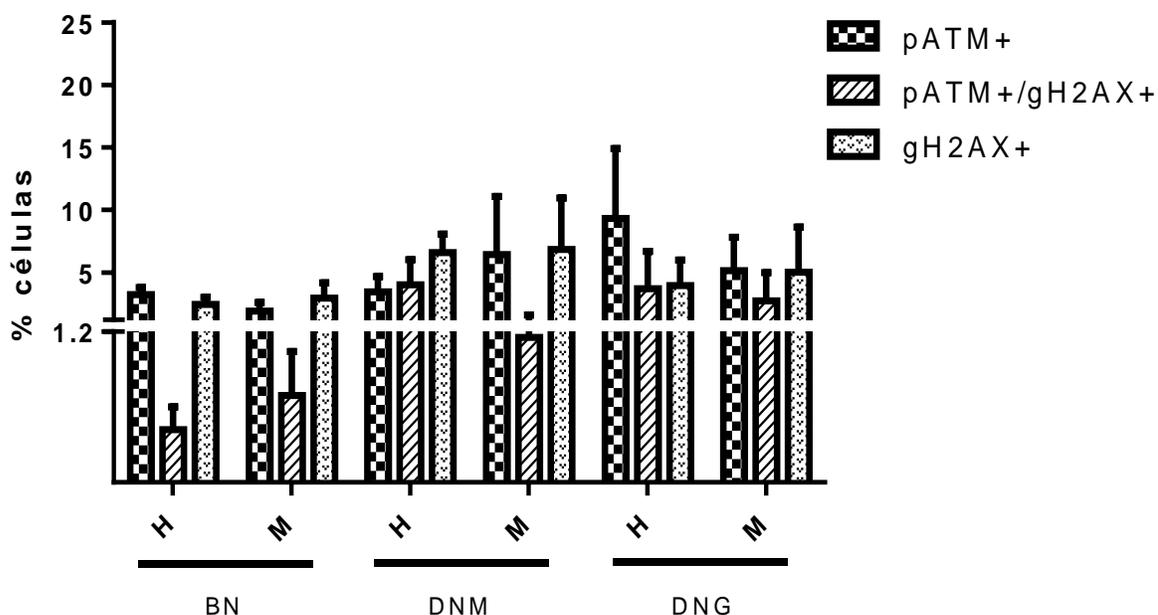


Gráfica 8. Linfocitos B en bazo P53t/P53-pSer15. Porcentajes de linfocitos T en muestras de bazo del grupo testigo (BN, n=6), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por citometría de flujo. ($P \leq 0.05$) indica diferencias significativas: * vs BN y < vs DNM.

9.3.6 Porcentaje positivo a las proteínas fosforiladas de acuerdo con el sexo

9.3.6.1 pATM/gH2AX en sangre

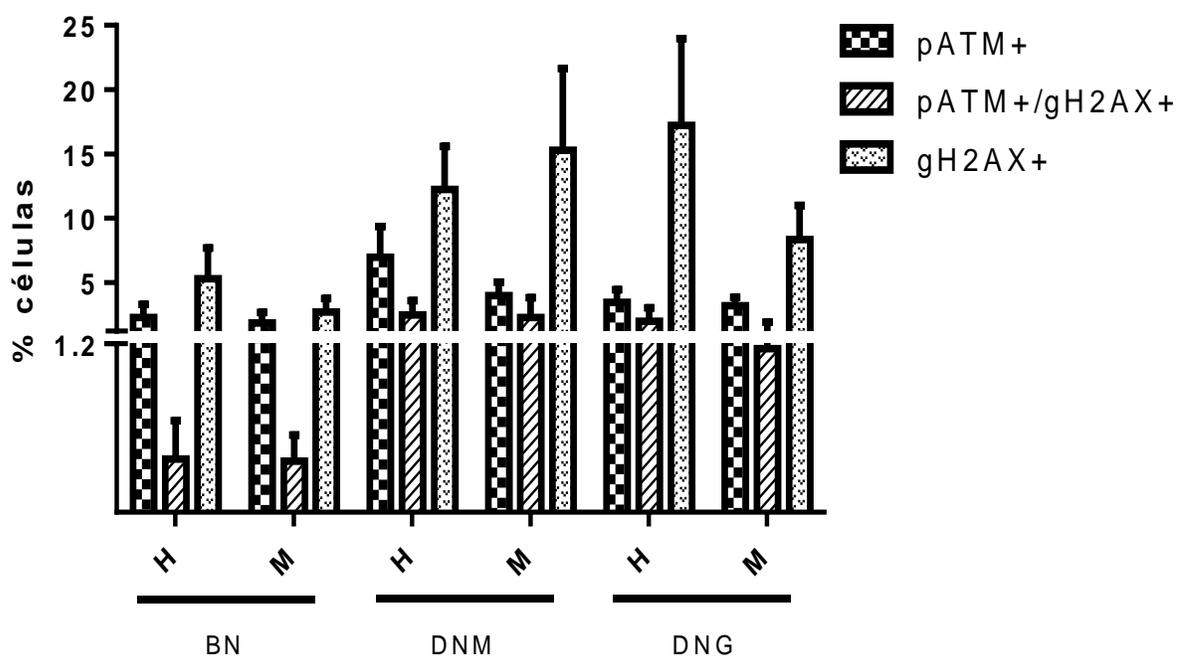
Aunque se observó una tendencia al incremento en los porcentajes de linfocitos T pATM+, dobles positivos (pATM+/gH2AX+) y gH2AX+ en sangre periférica para ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) comparados con el grupo testigo por parte de hembras (H) y machos (M), ninguno de estos resultados fue estadísticamente significativo. Esta información se muestra en la Gráfica 9.



Gráfica 9. Comparación del porcentaje de linfocitos T en sangre pATM/gH2AX por sexo. Porcentajes de linfocitos T en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por citometría de flujo,

separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=4 y machos (M) n= 5; grupo DNM H=5 y M=5; grupo DNG H=4 y M=4.

Los porcentajes de linfocitos B pATM+, dobles positivos (pATM+/gH2AX+) y gH2AX+ en sangre periférica mostraron una tendencia al incremento en ambos grupos desnutridos (DNM y DNG), comparados con el grupo testigo por parte de hembras y machos; estos resultados no fueron estadísticamente significativos, y se muestran en la Gráfica 10.

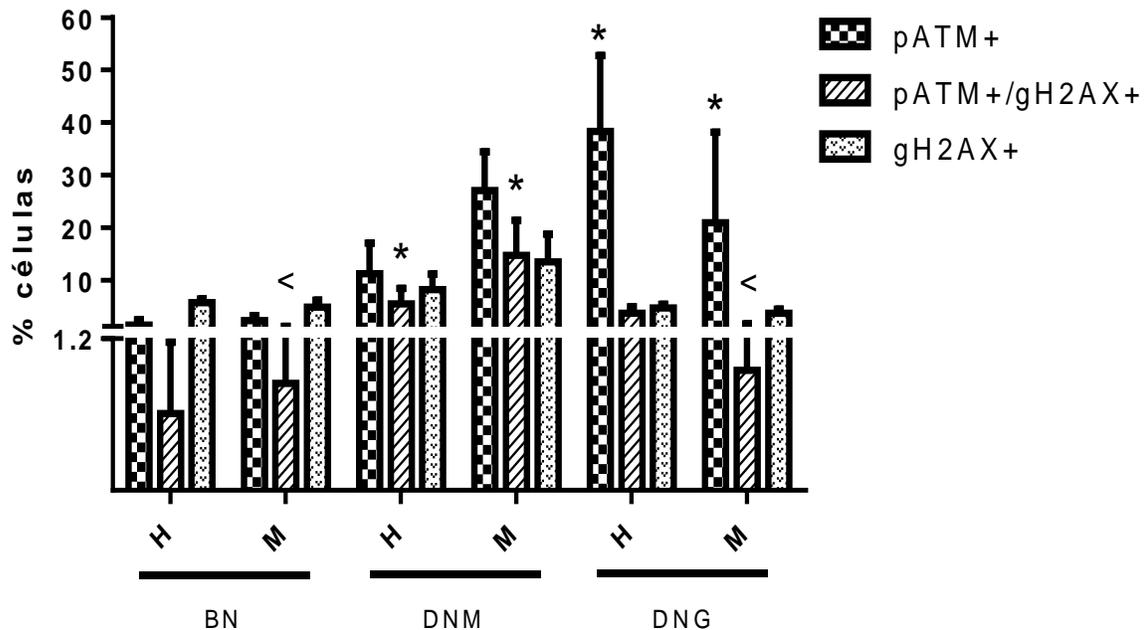


Gráfica 10. Comparación del porcentaje de linfocitos B en sangre pATM/gH2AX por sexo. Porcentajes de linfocitos B en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por

citometría de flujo, separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=4 y machos (M) n= 5; grupo DNM H=5 y M=5; grupo DNG H=4 y M=4.

9.3.6.2 pATM/gH2AX en bazo

Observamos un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de linfocitos T pATM+ de bazo en el grupo DNG comparado con el BN de 8.8 veces (comparación entre machos) y 25.8 veces (comparación entre hembras). De manera similar, el porcentaje de linfocitos T dobles positivos (pATM+/gH2AX+) en el grupo con DNM mostró un aumento estadísticamente significativo comparado con el grupo BN, de 9 veces (comparación entre hembras) y 17.4 veces (comparación entre machos). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T dobles positivos en los machos del grupo DNG, mostraron una disminución estadísticamente significativa de 15.5 veces, comparados con los machos del grupo DNM. Esta información se muestra en la Gráfica 11.

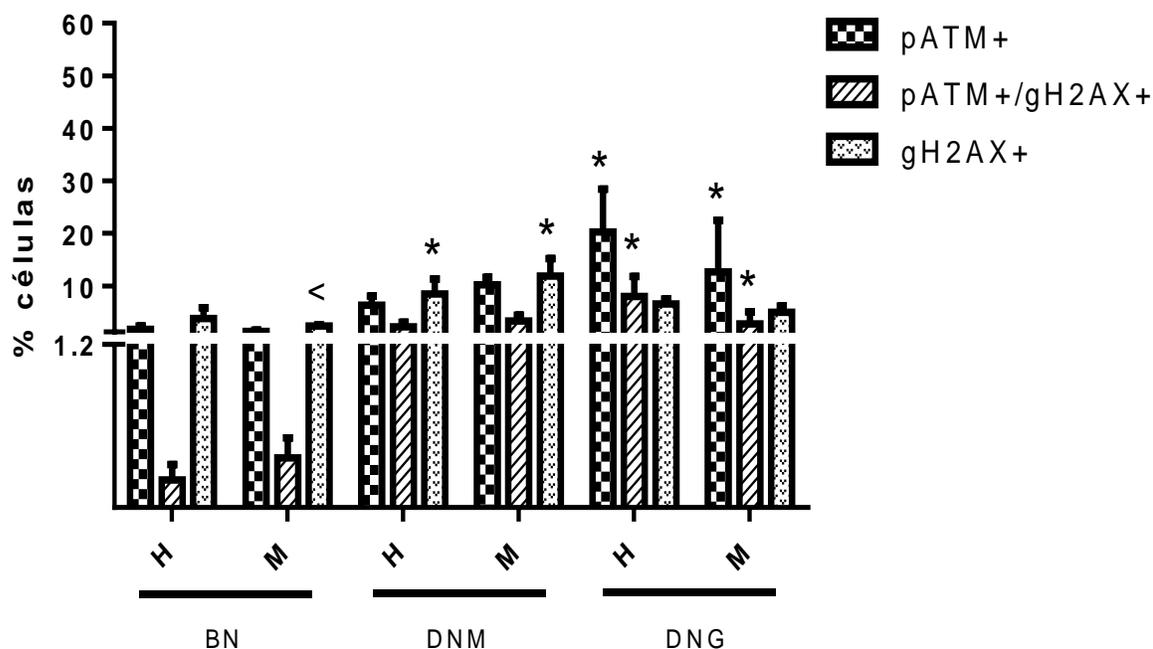


Gráfica 11. Comparación del porcentaje de linfocitos T en bazo pATM/gH2AX por sexo.

Porcentajes de linfocitos T en muestras de bazo del grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por citometría de flujo, separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=4 y machos (M) n= 5; grupo DNM H=5 y M=5; grupo DNG H=4 y M=4. (P ≤ 0.05) indica diferencias significativas: * vs BN y < vs DNM.

El porcentaje de linfocitos B pATM+ de bazo mostró un aumento significativo en el grupo DNG comparado con el BN de 9.7 veces (comparación entre machos) y 11.7 veces (comparación entre hembras). Así mismo, el porcentaje de linfocitos B dobles positivos (pATM+/gH2AX+) en el grupo con DNG mostró un aumento estadísticamente significativo comparado con el grupo BN, de 7.5 veces (comparación entre machos) y 39 veces (comparación entre hembras). Por otro lado, el grupo DNM mostró un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de

linfocitos B gH2AX+ de 2.2 veces (comparación entre hembras) y 5 veces (comparación entre machos), en comparación con el grupo BN; esta información se muestra en la Gráfica 12.

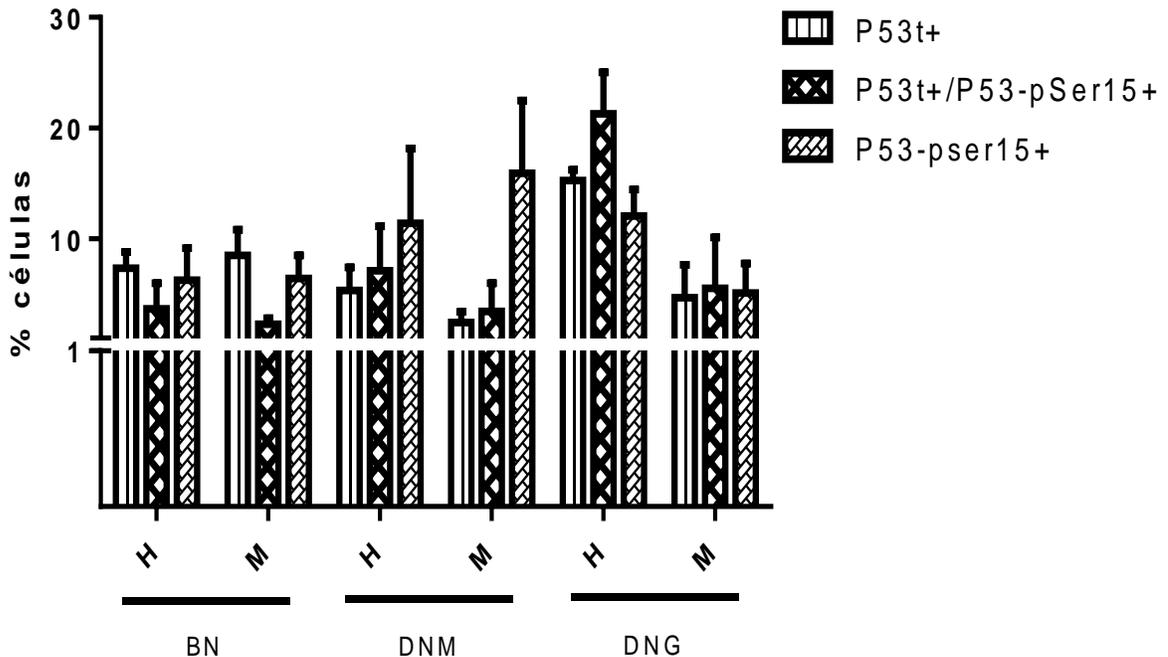


Gráfica 12. Comparación del porcentaje de linfocitos B en bazo pATM/gH2AX por sexo.

Porcentajes de linfocitos B en muestras de bazo del grupo testigo (BN, n=9), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=10), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=8) obtenidos por citometría de flujo, separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=4 y machos (M) n= 5; grupo DNM H=5 y M=5; grupo DNG H=4 y M=4. ($P \leq 0.05$) indica diferencias significativas: * vs BN y < vs DNM.

9.3.6.3 P53 en sangre

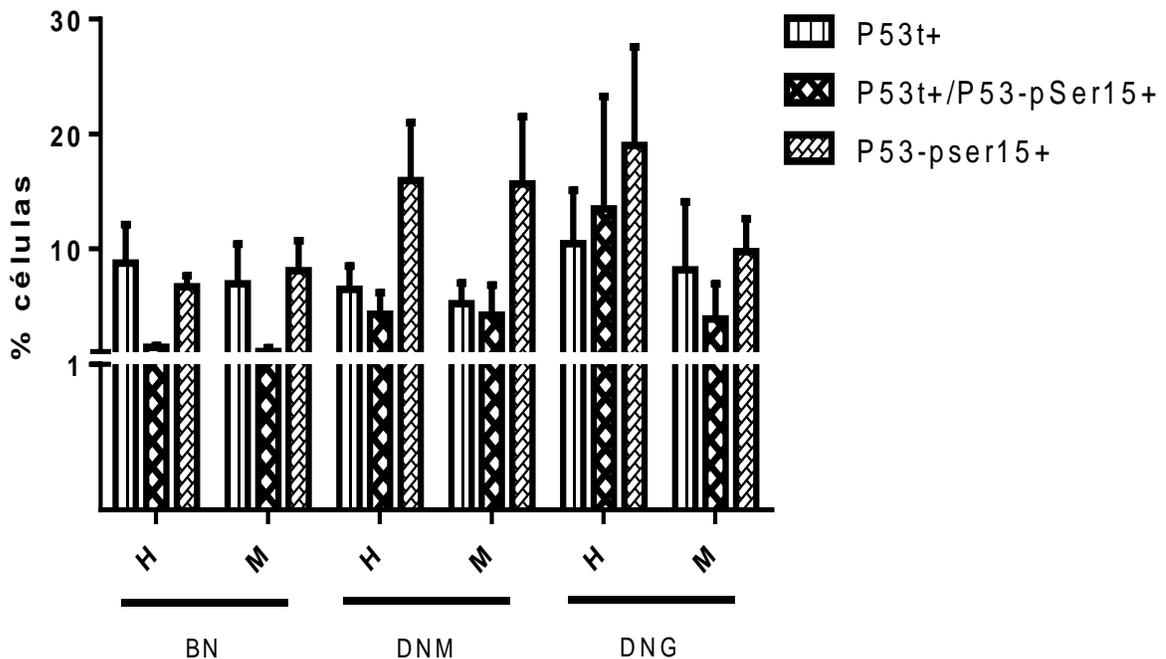
Los porcentajes de linfocitos T P53+ de sangre periférica mostraron una tendencia a disminuir en hembras y machos del grupo DNM y aumentan en el grupo DNG, comparados con el grupo BN. En cuanto a los porcentajes de linfocitos T dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+) y P53-pSer15+, presentaron una tendencia a incrementar en ambos grupos desnutridos, DNM y DNG, comparados con el grupo testigo en hembras y machos. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos, y se muestran en la Gráfica 13.



Gráfica 13. Comparación del porcentaje de linfocitos T en sangre P53t/P53-pSer15 por sexo. Porcentajes de linfocitos T en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=6), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por

citometría de flujo, separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=2 y machos (M) n= 4; grupo DNM H=5 y M=3; grupo DNG H=2 y M=3.

En los porcentajes de linfocitos B P53t+ de sangre periférica se observó una tendencia a disminuir en hembras y machos del grupo DNM y aumentan en el grupo DNG. Por su parte, los porcentajes de linfocitos B dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+) y P53-pSer15+ mostraron una tendencia a incrementar en hembras y machos de ambos grupos desnutridos, DNM y DNG, comparados con el grupo testigo; estos resultados no fueron estadísticamente significativos y se muestran en la Gráfica 14.

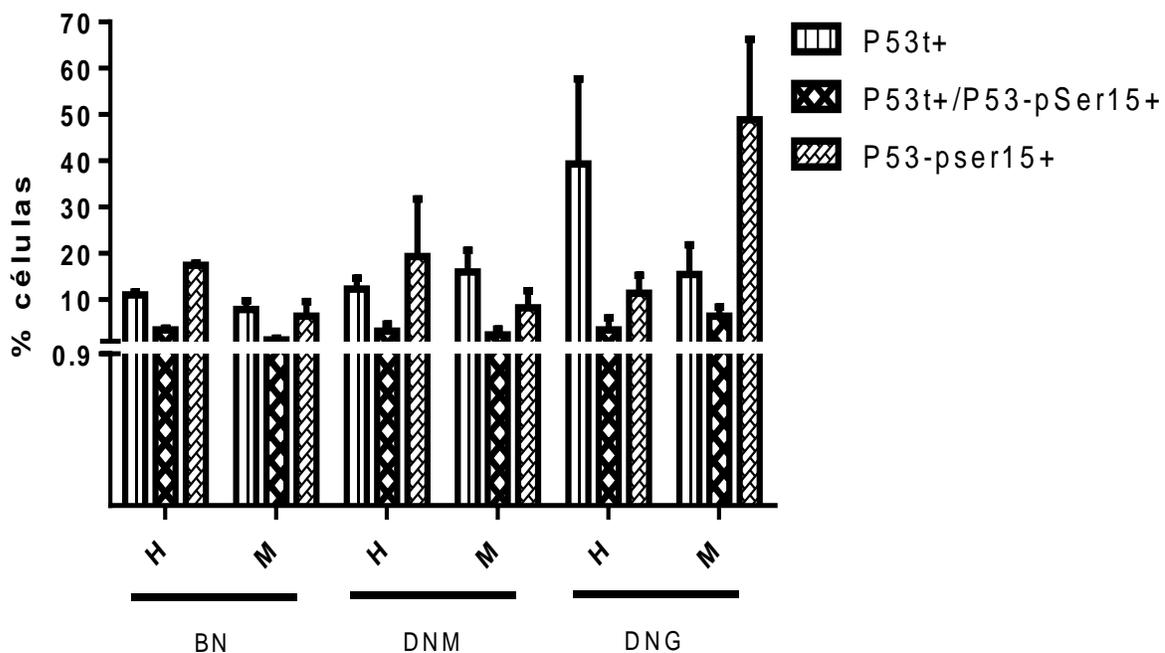


Gráfica 14. Comparación del porcentaje de linfocitos B en sangre P53t/P53-pSer15 por sexo. Porcentajes de linfocitos T en muestras de sangre del grupo testigo (BN, n=6), grupo con

desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por citometría de flujo, separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=2 y machos (M) n= 4; grupo DNM H=5 y M=3; grupo DNG H=2 y M=3.

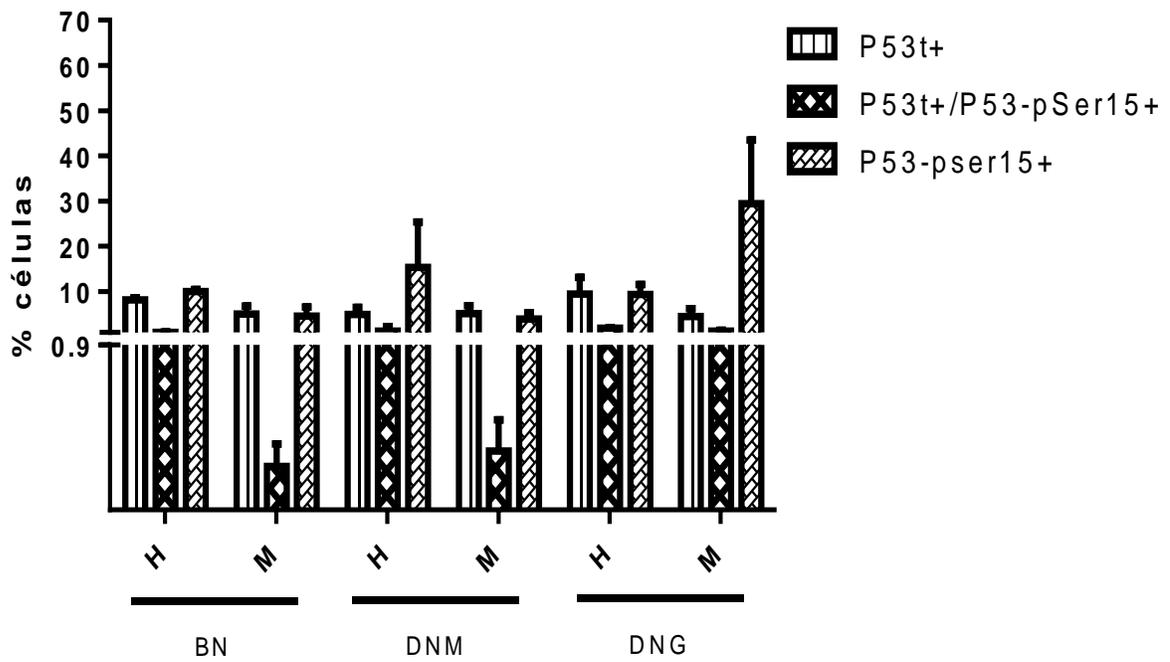
9.3.6.4 P53 en bazo

Los porcentajes de linfocitos T P53t+ de bazo mostraron una tendencia al incremento en hembras y machos de ambos grupos desnutridos, DNM y DNG, comparados con el grupo testigo. Por su parte, los porcentajes de dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+) de ambos grupos desnutridos, presentaron valores cercanos al testigo en hembras y machos. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos, y se muestran en la Gráfica 15.



Gráfica 15. Comparación del porcentaje de linfocitos T en bazo P53t/P53-pSer15 por sexo. Porcentajes de linfocitos T en muestras de bazo del grupo testigo (BN, n=6), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por citometría de flujo, separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=2 y machos (M) n= 4; grupo DNM H=5 y M=3; grupo DNG H=2 y M=3.

En cuanto a los porcentajes de linfocitos B P53t+ de bazo se observaron valores cercanos al testigo en ambos grupos desnutridos, DNM y DNG; estos resultados no fueron estadísticamente significativos, y se muestran en la Gráfica 16.



Gráfica 16. Comparación del porcentaje de linfocitos B en bazo P53t/P53-pSer15 por sexo. Porcentajes de linfocitos T en muestras de bazo del grupo testigo (BN, n=6), grupo con desnutrición moderada (DNM, n=8), y grupo con desnutrición grave (DNG, n=5) obtenidos por citometría de flujo, separados por sexo. Grupo BN hembras (H) n=2 y machos (M) n= 4; grupo DNM H=5 y M=3; grupo DNG H=2 y M=3.

10. DISCUSIÓN

10.1 Modelo para inducir desnutrición

La desnutrición presenta efectos sobre el adecuado desarrollo de los organismos al privarlos de las vitaminas y los minerales esenciales. Aproximadamente el 50% de todas las muertes en niños menores de 5 años, se le puede atribuir a la desnutrición y su relación con una combinación de factores de riesgo, incluidos: cuidados y alimentación inadecuados; proteína, energía y micronutrientes insuficientes, infecciones frecuentes, servicios de salud, agua potable y saneamiento deficientes. Lo anterior, resalta el hecho de que la desnutrición es causa y consecuencia de la pobreza (Batis y cols., 2020; Carroll y cols., 2017).

De acuerdo con información proporcionada por la OMS, la desnutrición moderada afecta a una gran cantidad de infantes menores de 5 años, que habitan en los países en vías de desarrollo. Esta situación es bastante preocupante si consideramos que, de no recibir el apoyo necesario, este grado de desnutrición puede progresar rápidamente hacia la desnutrición grave, poniendo en peligro la vida del infante (OMS, 2010). Es posible lograr una reducción evidente en los casos de menores que presentan desnutrición, comenzando por mejorar la nutrición materna, promover la práctica de la lactancia materna, así como su inicio temprano, y el abastecimiento oportuno de una alimentación completa y de buena calidad para bebés y niños en edad preescolar (Abdulahi y cols., 2017).

Para estudiar los efectos de la desnutrición a diferentes niveles, los modelos animales han sido muy útiles, teniendo en cuenta que pueden controlarse factores no nutricionales que afectan los estudios en humanos, como las infecciones y los medicamentos (Cortés-Barberena y cols., 2008). Si bien se han utilizado monos y cerdos para este fin, el modelo experimental de rata presenta varias ventajas, como su ciclo de vida relativamente corto, la posibilidad de realizar estudios *in vivo* e *in vitro*, la obtención de células provenientes de diferentes órganos y su utilidad en diferentes etapas de la vida, ya sea prenatal, posnatal y/o adulta (Arakawa, 2019).

Se han realizado estudios en ratas de edad mediana y adulta para intentar responder lo que sucede ante una restricción de alimento desde la edad temprana; lo anterior, ha permitido descubrir que la dirección de las alteraciones observadas en cada etapa de las ratas, depende del momento, tipo y la gravedad de la desnutrición (Remmers y cols., 2008). Esta información concuerda con lo observado en el grupo de trabajo, ya que los efectos de la desnutrición durante la lactancia son más graves que los observados en adultos (Ortiz y cols., 1996).

En nuestro laboratorio, utilizamos el modelo de desnutrición por el método de competencia de alimento en ratas lactantes, debido a que las primeras tres semanas de vida postnatal en ratas es un período crítico en su desarrollo; lo mismo sucede con la primera infancia en humanos, que es una etapa altamente vulnerable a la desnutrición debido al alto requerimiento de nutrientes (Ortiz y cols., 1996). La finalidad de este modelo es mostrar lo que podría estar sucediendo en los humanos con respecto a la disminución del acceso o la ausencia de una dieta completa.

En la búsqueda de descriptores de la DCP, se ha utilizado el índice de masa corporal (IMC) y el déficit de peso; sin embargo, este último es uno de los indicadores más utilizados en ratas para la evaluación del estado nutricional, debido a su simplicidad (Barbosa y cols., 2015; Molz y cols., 2016; Ortiz y cols., 2004). Durante la realización de este trabajo, también observamos en algunas ratas signos clínicos similares a los relacionados con la desnutrición en infantes, incluidos: ojos opacos, pérdida de pelo, hipotermia y respiración débil (Molz y cols., 2016).

10.2 Efecto de la desnutrición en los tejidos analizados

En etapas tempranas del desarrollo, la desnutrición genera cambios en el metabolismo, estructura y funcionalidad de los órganos, así como una reducción en su crecimiento (de Morais y cols., 2019). Lo anterior, concuerda con las observaciones obtenidas en este trabajo, donde el peso del bazo en ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) es menor comparado con el grupo BN; la estadística mostró diferencias significativas en ambos grupos con desnutrición DNM y DNG, comparados con el grupo testigo.

Los órganos linfoides, incluido el bazo, son especialmente susceptibles a los cambios estructurales causados por la desnutrición, lo que afecta la funcionalidad del sistema inmunológico (Mello y cols., 2014). En ratones desnutridos, se obstruye la capacidad proliferativa del bazo, disminuye el número de células pluripotentes, y se daña el material genético (Borelli y cols., 2009).

Dentro del grupo de trabajo, se cuenta con información previa que indica que la desnutrición modifica el ritmo idóneo del ciclo celular, reduce la proliferación y el número de células en el bazo, así como la relación existente entre el peso del bazo con el peso corporal; lo anterior indica que el número de células determina el peso del bazo. Toda esta información puede estar relacionada con la deficiencia de nutrientes y el aumento de los niveles de daño en el ADN (Cortés-Barberena y cols., 2013). Esta información concuerda con los datos que obtuvimos en el presente trabajo, donde se observó un mayor déficit de peso en los bazos de ratas pertenecientes al grupo DNG, seguido del grupo DNM, ambos comparados con el grupo testigo BN; estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Así mismo, la relación existente entre el peso del bazo con el peso corporal mostró diferencia estadísticamente significativa en el grupo DNM comparado con el DNG y en el grupo con DNG, en comparación con el grupo testigo BN. Sobre esta misma línea, Ortiz y colaboradores evidenciaron el aumento en la frecuencia de MN en linfocitos de bazo de ratas con desnutrición grave, comparado con el grupo BN (Ortiz y cols., 1995).

Así mismo, se observó frecuencia alta de MN en linfocitos, que aumenta al adicionar mitomicina C (MMC) en niños con desnutrición moderada y grave, en comparación con niños sanos bien nutridos (Ortiz y cols., 1997). Por otro lado, se demostró que la desnutrición grave en ratas está asociada con daño al material genético en bazo, médula ósea y sangre periférica utilizando ensayo cometa; lo anterior, podría estar relacionado con una menor capacidad para reparar el daño (Cortés y cols., 2001).

Por su parte, la importancia de analizar sangre periférica es que el oxígeno, los nutrientes, el agua, y los metabolitos se intercambian en este tejido; además, puede aportar información, como la condición física, metabólica e inmunológica del individuo (Huang y cols., 2017). Además, este tejido presenta ventajas, pues la toma de la muestra es relativamente fácil de obtener, por lo que de ser necesario, se pueden obtener varias muestras del mismo individuo (Hu y cols., 2018; Huang y cols., 2017).

Debido a estas particularidades, la sangre periférica se utiliza ampliamente para diversos bioensayos, dentro de los que se encuentran el diseño, eficacia y estrategia de vacunación, efectos de agentes patógenos y/o estresores, así como el efecto de la dieta, por mencionar algunos (Lulijwa y cols., 2019).

Al respecto, se observó que la frecuencia alta de MN en RET de sangre periférica derivada de la desnutrición grave en ratas, aumenta al administrar un medicamento utilizado en infantes para el tratamiento de infecciones respiratorias: trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) (Ortiz y cols., 2011); otro reporte muestra una frecuencia alta de MN en RET de niños con DCP moderada y grave, sugiriendo que las infecciones bacterianas y la desnutrición inducen daño al ADN (Cervantes-Ríos y cols., 2012). Así mismo, en 2014 muestran que niños con desnutrición moderada y grave presentan una alta frecuencia de MN en RET, siendo en su mayoría de tipo clastogénico; este tipo de MN surgen como resultado de DSBs (Cervantes-Ríos y cols., 2014).

10.3 Ataxia Telangiectasia Mutada, la histona H2AX y las rupturas de doble cadena

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la DCP inicialmente permite el correcto reconocimiento del daño al ADN por rupturas de doble cadena, basados en el porcentaje linfocitario (T y B) que muestra las proteínas fosforiladas pATM y gH2AX, que participan en esta función, empleando citometría de flujo. Esta metodología es útil para la realización de un análisis multiparamétrico y la detección rápida de la señal de gH2AX, lo cual permite relacionar estados funcionales en la célula con eventos DDR particulares (Dezorella y cols., 2015; Palla y cols., 2017; Zhao y cols., 2017).

ATM se ha denominado como una cinasa jerárquica, porque tiene la capacidad de iniciar muchas vías simultáneamente (Udayakumar y cols., 2015). La detección de H2AX fosforilada, asociada con ATM activa, proporciona un ensayo más sensible para detectar el material genético que se considera gravemente dañado por las DSBs (Tanaka y cols., 2007). Con respecto a las proteínas H2AX y ATM fosforiladas, nuestros datos muestran un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de linfocitos B pATM+ esplénicos de ambos grupos desnutridos en comparación con el del grupo testigo, con aumentos de 5.5 y 11.1 veces en los grupos DNM y DNG, respectivamente.

Los porcentajes de células T pATM+ esplénicas en ambos grupos desnutridos aumentaron significativamente (9.6 veces para DNM y 14.9 veces para DNG) en comparación con el del grupo testigo. Con respecto al porcentaje de células B dobles

positivas (pATM+/gH2AX+), el grupo DNM mostró un aumento significativo de 9.2 veces en comparación con el del grupo BN. Es importante destacar que ambas proteínas pueden verse afectadas en nuestro modelo experimental, porque en los mamíferos, la deficiencia de nutrientes afecta la tasa de síntesis de proteínas en las células y los tejidos (Márquez-Mota y cols., 2016), lo que afecta el crecimiento y la maduración del organismo. Estas alteraciones pueden extenderse a los órganos y sistemas y las alteraciones nutricionales tempranas se correlacionan con efectos más graves (Pereyra-Venegas y cols., 2015).

El porcentaje de células T dobles positivas en el grupo DNM aumentó significativamente 13.6 veces en comparación con el del grupo BN. Además, el porcentaje de linfocitos B gH2AX+ esplénicos en el grupo DNM se incrementó significativamente en 3.3 veces, e igualmente el grupo DNG presentó un aumento de 1.9 veces, estos valores comparados con el del grupo testigo. Por su parte, en sangre periférica los porcentajes de linfocitos B gH2AX+ de ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) mostraron un aumento estadísticamente significativo de 3.5 y 3.3 veces respectivamente, comparados con el grupo BN. Estas diferencias entre las poblaciones celulares (células T y B) en los tejidos analizados (sangre periférica y bazo) podrían indicar que ciertos linajes están protegidos en mayor medida (Carranza y cols., 2017).

En un estudio de Abe y cols., se demostró que los linfocitos B son más sensibles a la deficiencia de folato que las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T (Abe y cols., 2013), lo anterior, puede estar relacionado con que los

linfocitos T tienen una mayor capacidad para la síntesis durante la reparación del daño del ADN que los linfocitos B, así como las diferencias en el tiempo de vida de los linfocitos (Lebailly y cols., 2015). Los linfocitos dependen más de ATM para la detección de DSBs y el reclutamiento de factores para la reparación de la lesión, debido a que son células que no se dividen (Horn y cols., 2015).

Aquí, demostramos que DNM y DNG pueden aumentar los porcentajes de linfocitos T y B de rata que son positivos para pATM y gH2AX que indica un reconocimiento efectivo de daño en el ADN. Información previa relacionada, indica que las células B en reposo reparan el ADN dañado con menos eficacia que las células B estimuladas (Hyka-Nouspikel y cols., 2011).

Previamente en nuestro laboratorio se observó una alta frecuencia de MN en linfocitos esplénicos (Ortiz y cols., 1995) y RET en sangre periférica procedentes de ratas con desnutrición grave (Ortiz y cols., 2011), que podrían estar relacionadas con deficiencias en varios nutrientes esenciales necesarios para la síntesis de proteínas asociadas con el ADN, como el folato, el magnesio, la vitamina B12 y el zinc (Ortiz y cols., 1995). Esta observación es importante porque los MNs se generan principalmente por DSBs sin reparar o mal reparados (Bajinskis y cols., 2013; Bonassi y cols., 2007), que probablemente se relacionan con los valores obtenidos en el presente estudio, como los porcentajes promedio de linfocitos T y B gH2AX+ en la sangre periférica y las muestras esplénicas de ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) mostraron una tendencia a aumentar en comparación con las del grupo BN. Estos resultados sugieren que el daño en los grupos BN y DNM se reconoció y

reparó efectivamente, mientras que en el grupo DNG se reconoció, pero no se reparó, probablemente debido a una alteración en la continuidad de la ruta de señalización en el grupo DNG.

Los anterior puede estar relacionado con el hecho de que las células inmunológicas dependen de la absorción de nutrientes de su entorno para satisfacer sus necesidades energéticas (Cohen y cols., 2017). La disfunción de las HSCs, la involución del timo y la consecuente disminución de células T generan la remodelación del sistema inmunológico, provocando una acumulación de células disfuncionales. Los defectos durante el desarrollo, maduración, migración y homeóstasis de las células inmunológicas agravan este panorama (Müller y cols., 2019).

Estos datos abren la posibilidad de realizar más investigaciones sobre este tema para dilucidar en qué punto de la vía de señalización existen las alteraciones que producen que este daño no se repare en ratas con desnutrición grave, lo que genera un aumento en el daño al ADN, según lo indica resultados que presentamos anteriormente (Cortés y cols., 2001; Ortiz y cols., 1995). Aunque la variante de histona H2AX está fosforilada, este evento puede no ser suficiente para activar la cascada de señalización posterior. Estos resultados están potencialmente relacionados con una deficiencia en la continuidad de DDR, o con alteraciones en la funcionalidad de los leucocitos, así como con la hipoplasia en órganos linfo-hematopoyéticos en animales desnutridos (Fock y cols., 2012).

Al comparar el porcentaje positivo para las proteínas pATM y gH2AX de acuerdo con el sexo, observamos un aumento en el porcentaje de linfocitos T pATM+ en bazo, de 8.8 veces (comparación entre machos) y 25.8 veces (comparación entre hembras) por parte del grupo DNG comparado con el BN. Así mismo, observamos un aumento en el porcentaje de linfocitos T dobles positivos (pATM+/gH2AX+) de 9 veces (comparación entre hembras) y 17.4 veces (comparación entre machos) por parte del grupo DNM comparado con el BN. Por otro lado, observamos una disminución en el porcentaje de linfocitos T dobles positivos en los machos de 15.5 veces por parte del grupo DNG comparado con el DNM. En cuanto al porcentaje de linfocitos B pATM+ en bazo, observamos un aumento de 9.7 veces (comparación entre machos) y 11.7 veces (comparación entre hembras) por parte del grupo DNG comparado con el BN. De igual manera, observamos un aumento en el porcentaje de linfocitos B dobles positivos (pATM+/gH2AX+) de 7.5 veces (comparación entre machos) y 39 veces (comparación entre hembras), por parte del grupo DNG comparado con el grupo BN. Así mismo, respecto al porcentaje de linfocitos B gH2AX+, se observó un aumento de 2.2 veces (comparación entre hembras) y 5 veces (comparación entre machos) por parte del grupo DNM en comparación con el grupo BN.

Respecto a la información anterior, se ha reportado que las ratas macho son más susceptibles a la restricción de alimentos pre y postnatal que las ratas hembra (Pereyra-Venegas y cols., 2015). Adicionalmente, cabe indicar que, aunque se dispone de información limitada sobre los mecanismos exactos por los cuales las

vías de señalización modulan el sistema inmunológico en condiciones de desnutrición, de Oliveira y colaboradores (2014) proporciona un ejemplo. En este estudio, los ratones BALB/c de dos meses de edad se dividieron en dos grupos: los alimentados con una dieta baja en proteínas y los alimentados con una dieta control. Después de 28 días de consumir las dietas respectivas, los autores observaron que la expresión de NF- κ B fosforilada (importante para el correcto funcionamiento de los macrófagos) en ratones desnutridos disminuyó en comparación con la de los ratones alimentados con la dieta control (de Oliveira y cols., 2014).

Para llevar a cabo la modificación posterior a la traducción de la fosforilación, las proteínas cinasas utilizan el ATP como donante de fosfato y se unen a un grupo hidroxilo de los residuos de serina, treonina o tirosina de la proteína objetivo (Taehong Yang y Terman, 2017); de manera similar, la energía requerida para todos los procesos celulares se obtiene de ATP (Ledderose y cols., 2014). Los resultados obtenidos por de Oliveira y colaboradores, en conjunto con los que se encuentran en el presente estudio son probablemente el producto del consumo inadecuado de proteínas por parte de los grupos experimentales, ya que la ingesta de proteínas es vital para el suministro de ATP a todos los órganos del cuerpo y proporciona una carga de energía adecuada (Ahmed-Farid y cols., 2017).

Este estudio es el primero en utilizar el ensayo gH2AX para detectar DSBs en el material genético como resultado de la desnutrición experimental moderada y grave en ratas Wistar inducida por el método de competencia de alimento. El ensayo

gH2AX proporciona evidencia de procesos relacionados con el reconocimiento del daño al ADN causado por los DSBs (Kurashige y cols., 2016).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que la vía canónica de reconocimiento para las DSBs era la misma a través de la cual la cinasa ATM respondía ante el estrés oxidante. Sin embargo, actualmente se conoce que hay una vía alternativa a través de la cual, la célula responde ante las DSBs causadas por estrés oxidante; en este otro mecanismo, los homodímeros ATM se activan directamente por oxidación del grupo tiol de su Cys2991, evitando la autofosforilación dependiente de MRN. Una vez activos, fosforilan sustratos distintos que participan en otros procesos celulares, como es el caso de la fosforilación de AKT en Ser473, que participa en el metabolismo de la glucosa (Berger y cols., 2017; Tang y cols., 2015).

Es importante recalcar que ATM puede fosforilar a cientos de proteínas blanco (o diana), razón por la cual se estima que afecta miles de proteínas asociadas y regula muchas enzimas (Lee y Paull, 2020). Por lo anterior, se necesitan más estudios al respecto para dilucidar las funciones específicas de la autofosforilación de ATM en S1981 (Blackford y Jackson, 2017).

10.4 La proteína P53 y las rupturas de doble cadena

En el presente trabajo, el porcentaje de linfocitos T P53t+ en sangre periférica disminuye en el grupo DNM y aumenta en el grupo con DNG, en comparación con el grupo testigo. Por su parte, se observaron porcentajes mayores de células T dobles

positivas (P53t+/P53-pSer15+) en ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) comparados con el grupo testigo BN. Con respecto al porcentaje de linfocitos T P53-pSer15+, ambos grupos con desnutrición, DNM y DNG, muestran porcentajes mayores comparados con el grupo testigo; cabe indicar que estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Algo similar sucede con el porcentaje de linfocitos B P53t+ en sangre periférica, donde en el grupo DNM disminuye y aumenta en el grupo con DNG, en comparación con el grupo testigo. En cuanto al porcentaje de células B dobles positivas (P53t+/P53-pSer15+), ambos grupos con desnutrición, DNM y DNG, mostraron un aumento con respecto al grupo testigo BN. A su vez, los porcentajes de linfocitos B P53-pSer15+ en ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG), mostraron aumento en comparación con el grupo BN; estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Es probable que el comportamiento observado se deba al hecho de que posterior a la activación de P53, las respuestas celulares pueden verse afectadas por vías de señalización adicionales que están activas en las células, debido a que existe una extensa interacción entre ellas (Lieschke y cols., 2019). Sobre esta línea, cabe resaltar que la fosforilación en la serina 15 de P53 se ubica en el dominio TA de esta proteína, lo que la hace importante para su actividad transcripcional. Así mismo, esta modificación es la respuesta principal para la activación de P53, debido a que promueve su asociación con acetiltransferasas de histonas (HATs), lo cual, es primordial para la estabilización y activación de P53. Además, es una de las respuestas primarias al daño del ADN (Taewoo Yang y cols., 2019).

Dentro de los resultados de este trabajo, también se observaron porcentajes mayores de linfocitos T P53t+ de bazo, en ambos grupos desnutridos (DNM y DNG) comparados con el grupo testigo BN. Este comportamiento se mantiene para el porcentaje de linfocitos T dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+) y P53-pSer15+, donde ambos grupos desnutridos, DNM y DNG, mostraron aumento en comparación con el grupo testigo; estos resultados no fueron significativos. Por su parte, se observaron porcentajes de linfocitos B P53t+ en bazo de ambos grupos desnutridos, DNM y DNG, muy cercanos al grupo testigo. En cuanto al porcentaje de células B dobles positivas (P53t+/P53-pSer15+), ambos grupos con desnutrición mostraron aumento en comparación con el grupo BN, siendo estadísticamente significativo el aumento por parte del grupo DNG de 3.2 veces comparado con el grupo BN y de 1.6 veces, comparado con el grupo DNM. A su vez, los porcentajes de linfocitos B P53-pSer15+ en ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG), mostraron aumento en comparación con el grupo BN, siendo estadísticamente significativo el aumento por parte del grupo DNG de 3.3 veces, comparado con el testigo.

Respecto a los valores obtenidos, es importante mencionar que no se ha reportado información en torno a las funciones de P53 en organismos desnutridos, sin embargo, dependiendo del contexto celular, P53 podría apoyar la adaptación y la supervivencia de las células en respuesta al agotamiento de nutrientes (Hashimoto y cols., 2019).

Posterior al estrés celular, la mayoría de los sitios en la proteína P53 se fosforilan rápidamente; cabe mencionar, que para activarse completamente esta

proteína requiere abundantes MPTs, de manera que su combinación precisa funciona como una señal para activar vías específicas. Ejemplo de ello es la ubiquitinación, que puede regular diversas funciones en esta proteína, como su estabilidad y localización: la monoubiquitinación facilita la translocación citoplasmática de P53, y la poliubiquitinación la dirige a la degradación proteosómica. Por otro lado, la interacción exacta entre las MPTs metilación, sumoilación y neddylación en P53, pueden contribuir a su especificidad en las regiones promotoras (Wang y cols., 2020).

Los principales mecanismos por medio de los cuales P53 orienta el destino celular en respuesta ante el daño al ADN, son: la modulación de la unión del ADN por P53 a través de la secuencia del ADN y la estructura de la cromatina, las interacciones con cofactores, la dinámica de expresión temporal de P53 y las MPTs. Así mismo, la proteína P53 debe tomar en cuenta varios aspectos para elegir la vía que activará, de acuerdo con el entorno y tipo celular, el momento y alcance de la ruta, así como la extensión y el tipo de daño (Hafner y cols., 2019; Pitolli y cols., 2019).

Al comparar el porcentaje celular positivo para la proteína P53 sin fosforilar y fosforilada en Ser 15, de acuerdo con el sexo, observamos una tendencia a disminuir el porcentaje de linfocitos T y B P53t+ de sangre periférica en ambos sexos (H y M) por parte del grupo DNM comparado con el grupo BN; contrariamente, el grupo DNG muestra una tendencia al incremento en el porcentaje de linfocitos T y B P53t+ primordialmente en hembras, comparado con el grupo BN. En el caso de los

linfocitos T y B dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+) y P53-pSer15+ de sangre periférica, mostraron una tendencia a incrementar por parte de ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG) y de ambos sexos (H y M), comparados con el grupo BN. Por su parte, el porcentaje de linfocitos T y B P53t+ de bazo, muestra una tendencia a incrementar por parte de ambos grupos DNM y DNG, primordialmente en hembras, comparado con el grupo BN. En el caso de los linfocitos T y B dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+) y P53-pSer15+ de bazo, mostraron una tendencia a incrementar por parte de ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG) y de ambos sexos (H y M), comparados con el grupo BN. Se necesita aumentar el número de ratas con el objetivo de observar si estas tendencias se mantienen y arrojan diferencias significativas.

Es de llamar la atención la versatilidad con la que trabaja P53, pues con el objetivo de facilitar la reparación del daño al ADN, temporalmente aumenta la síntesis de nucleótidos; por otro lado, en condiciones normales puede suprimir la síntesis de nucleótidos para regular negativamente la proliferación celular (Liu y cols., 2019).

ATM controla la velocidad de síntesis de la proteína P53 y su estabilización por medio de la fosforilación directa de esta proteína en la serina 15, de esta manera, evita que MDM2 se una a P53, impidiendo su degradación a través de la vía proteosómica (Karakostis y cols., 2019).

Se ha sugerido que el factor de remodelación y espaciado 1 (RSF1) participa como defensor clave contra el daño al ADN por DSBs, al influir en la señalización

dependiente de ATM, pues es necesario para la adecuada expansión de gH2AX y la reparación de este tipo de daño. Así mismo, es de suma importancia la participación de RSF1 en la determinación del destino celular dependiente de P53 ante el daño al ADN (Min y cols., 2018).

Por otro lado, las proteínas RUNX son una familia de factores de transcripción heterodiméricos que tienen funciones importantes durante el desarrollo de muchos tejidos y del sistema inmunológico, además, existe una fuerte relación entre estas proteínas RUNX y P53 al interactuar entre sí en presencia de agentes que dañan al ADN. Específicamente, la proteína RUNX3 es esencial para el desarrollo de las células T; así mismo, al interactuar con P53, mejora su fosforilación en la serina 15 en respuesta al daño en el ADN (Bae y cols., 2019).

Por lo tanto, se deben realizar estudios adicionales sobre el daño en el ADN inducido por DSBs en organismos desnutridos, profundizando en los factores que participan en la continuidad de la vía de señalización para repararlos.

10.5 Comentarios generales

La detección, señalización y reparación del daño al ADN oportuna y eficiente son pasos críticos para que las células sobrevivan al estrés genotóxico. Este proceso de reparación requiere mucha energía, por lo que consume gran cantidad de ATP (Ho y cols., 2018; Qin y cols., 2015). Cabe mencionar, que resultan determinantes para el proceso de reparación y su resultado, la estructura y conformación de los extremos de ADN (Serrano-Benítez y cols., 2020).

Como se había mencionado previamente, las respuestas celulares pueden verse afectadas por vías de señalización adicionales que están activas en las células, debido a que existe una extensa interacción entre ellas. Actualmente se sabe poco respecto a los mecanismos por los cuales las células regulan e integran estas vías para mantener la variación de la secuencia bajo control, de manera que la DDR pueda llevarse a cabo adecuadamente (Lieschke y cols., 2019; Serrano-Benítez y cols., 2020).

La señalización del daño al ADN por DSBs en organismos desnutridos no había sido investigada, hasta ahora. Respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos suponer que se gestan desde el inicio, debido a que dentro de los tipos de estrés que afectan directamente la función de las HSCs se encuentran el daño al ADN, la inflamación, infección aguda o crónica, estrés metabólico, obesidad y estrés psicosocial (Laurenti y Göttgens, 2018). Esta información resulta importante, puesto que la desnutrición por sí misma genera daño al ADN, como lo ha demostrado el intercambio de cromátidas hermanas, incremento en la frecuencia de MN y daño al ADN, observados en organismos con este padecimiento (Betancourt y cols., 1986; Cortés y cols., 2001; Ortiz y cols., 1994, 1995, 2011).

Esta susceptibilidad de los organismos desnutridos a presentar daño al ADN elevado puede deberse a varias causas. Por ejemplo, se ha observado que la restricción del aminoácido condicional glicina afecta varios procesos celulares debido a que participa como neurotransmisor en el sistema nervioso central, en la

citoprotección y conjugación de ácidos biliares, así como en la síntesis de purinas y proteínas. Cabe indicar que los aminoácidos participan como biomoléculas activas en el metabolismo nutricional, y son actualmente conocidos como “sustratos nutrientes” para la síntesis de proteínas (Nie y cols., 2018; Semba y cols., 2016). Dada la pobre ingesta de nutrientes en los organismos desnutridos, la cantidad de aminoácidos esenciales para producir proteínas en cantidad y calidad suficiente se ve disminuida (Semba y cols., 2016).

Además de que el consumo inadecuado de alimento provoca alteraciones importantes a nivel morfológico, bioquímico y funcional de los organismos desnutridos, ocasiona una pérdida de ARN y reduce su tasa de síntesis (Ruiz-Rosado y cols., 2013). Por otro lado, se ha observado que la vitamina C participa en la regulación epigenética, ejerciendo su acción de cofactor de las dioxigenasas que contienen hierro e hidroxilan al ADN y las histonas metiladas (Carr y Maggini, 2017).

Actualmente, se ha reportado que la carencia de ciertas vitaminas del tipo B (B2, B6 y B9) puede traer consigo alteraciones en la respuesta inmunológica, debido a que repercute en la producción de ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas; además, inhibe la actividad de las células inmunológicas e interfiere en procesos como los ciclos de metilación, el mantenimiento celular y la proliferación. Cabe resaltar, que la vitamina B2 está asociada con la producción de energía (Mikkelsen y cols., 2019). El ATP se considera como el factor de intercambio de energía, y participa en procesos celulares como la contracción móvil, el transporte activo y las fosforilaciones (Bonora y cols., 2012); con lo anterior, suponemos que dado el

consumo inadecuado de nutrientes por parte de los grupos experimentales, que trae consigo un suministro de energía bajo, le resultaría difícil a las células provenientes de estos organismos desnutridos generar las proteínas necesarias en cantidad y calidad, así como llevar a cabo su fosforilación para desencadenar la respuesta de reparación adecuada. Recientemente, se ha propuesto que la vitamina E puede mejorar la función de los linfocitos T al promover directamente la integridad de la membrana y modular positivamente los eventos de señalización en estas células (Wu y cols., 2019), lo cual, permite ver que aún queda mucho por investigar para proporcionar información respecto a lo que está sucediendo en las vías de señalización en organismos desnutridos.

10.6 Resumen gráfico de los hallazgos

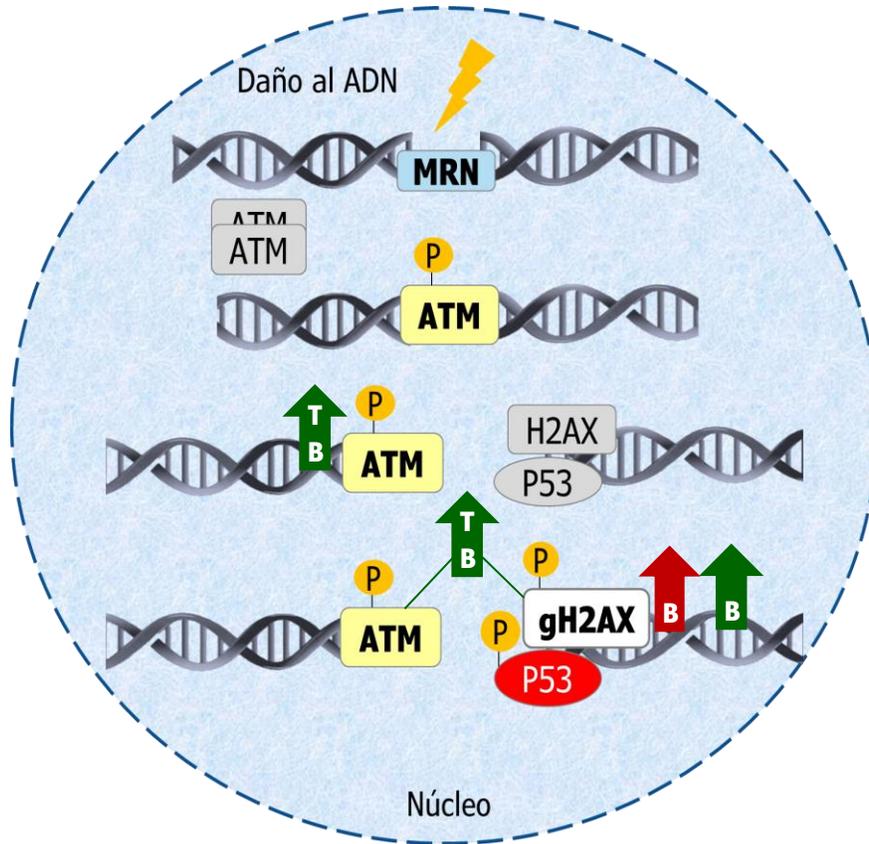


Figura 12. Resultados estadísticamente significativos obtenidos en el grupo de ratas con desnutrición moderada. Se ilustran los resultados con flechas ascendentes de color verde, para indicar que el tejido donde se observan estas diferencias es bazo, o de color rojo, para sangre periférica. Se ubican a un costado de la proteína fosforilada a la que se refieren: pATM (ATM fosforilada en serina 1981) o gH2AX (histona variante H2AX fosforilada en la serina 139); para indicar los dobles positivos (pATM+/gH2AX+), ambas proteínas se unen con un par de líneas diagonales. Dentro de la flecha se indica con la letra “T” si la diferencia se observó en los linfocitos T, o la letra “B” si se refiere a los linfocitos B.

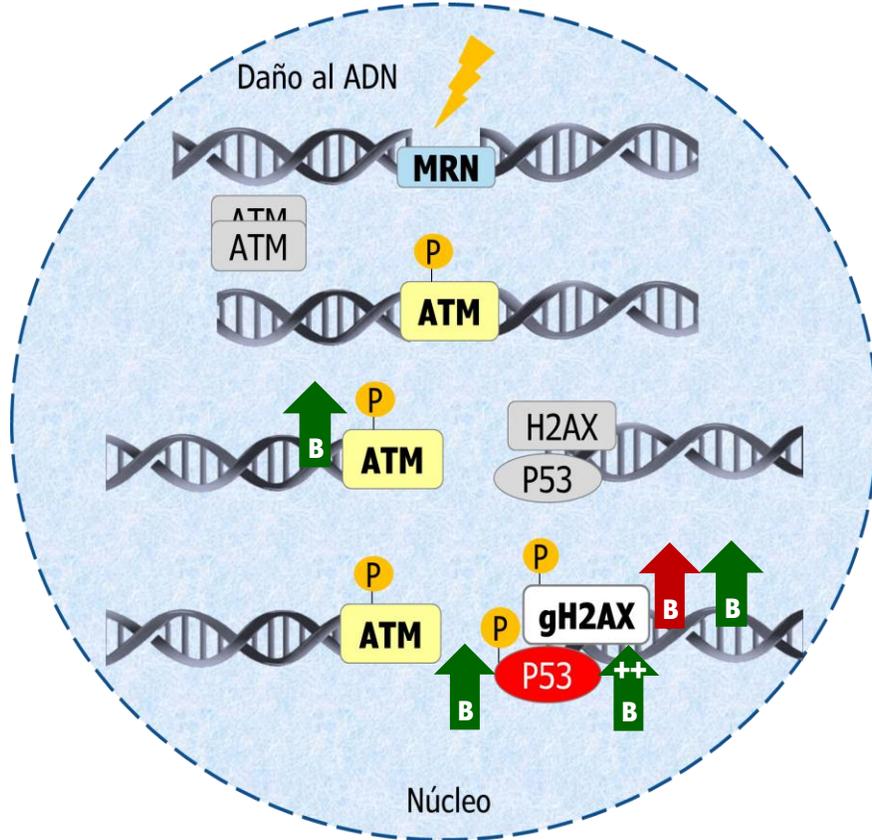


Figura 13. Resultados estadísticamente significativos obtenidos en el grupo de ratas con desnutrición grave. Resultados significativos obtenidos en el grupo de ratas con desnutrición moderada. Se ilustran los resultados con flechas ascendentes de color verde, para indicar que el tejido donde se observan estas diferencias es bazo, o de color rojo, para sangre periférica. Se ubican a un costado de la proteína fosforilada a la que se refieren: pATM (ATM fosforilada en serina 1981), gH2AX (histona variante H2AX fosforilada en la serina 139), o P53-pSer15 (proteína P53 fosforilada en serina 15). Para indicar los dobles positivos (P53t+/P53-pSer15+), la flecha tiene un par de signos de suma (++) . Dentro de la flecha se indica con la letra "T" si la diferencia se observó en los linfocitos T, o la letra "B" si se refiere a los linfocitos B.

11. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir:

1.- Se lograron detectar las rupturas de doble cadena mediante el ensayo de gH2AX asociado con pATM, evidenciando que la DN genera daño por este tipo de lesiones en linfocitos de sangre periférica y bazo.

2.- Ambos grupos con desnutrición, DNM y DNG, presentaron incremento en el porcentaje de linfocitos T y B pATM+ de bazo, comparados con el grupo BN, lo cual sugiere que la proteína ATM se encuentra activa en el modelo de desnutrición.

3.- Se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos T y B dobles positivos (pATM+/gH2AX+) de bazo, en ambos grupos con desnutrición (DNM y DNG), comparados con el grupo BN; esta información sugiere que la desnutrición inicialmente permite el correcto reconocimiento del daño al ADN por rupturas de doble cadena.

4.- El incremento en el porcentaje de linfocitos B gH2AX+ en sangre y bazo de ambos grupos desnutridos (DNM y DNG), comparados con el grupo BN, indica que la desnutrición induce daño al ADN por rupturas de doble cadena, y plantea una respuesta diferencial de acuerdo con el linaje celular.

5- Es importante aumentar el número de ratas analizadas, de tal manera que cada grupo cuente con la misma cantidad para pATM+/gH2AX+ y P53, con el objetivo de confirmar que dicho comportamiento se conserva, corroborar si las tendencias observadas se mantienen y presentan diferencias significativas.

Como conclusión general, en las ratas expuestas a DCP mediante competencia de alimento se ve comprometida la respuesta celular ante el daño al ADN, incluida su reparación, de acuerdo con los resultados observados.

11.1 CONSIDERACIONES FINALES

Es importante resaltar que la información que se aporta con el presente trabajo abarca sólo una parte de la vía de señalización del daño al ADN por DSBs y del entorno en donde se desarrolla, como lo muestra la Figura 14.

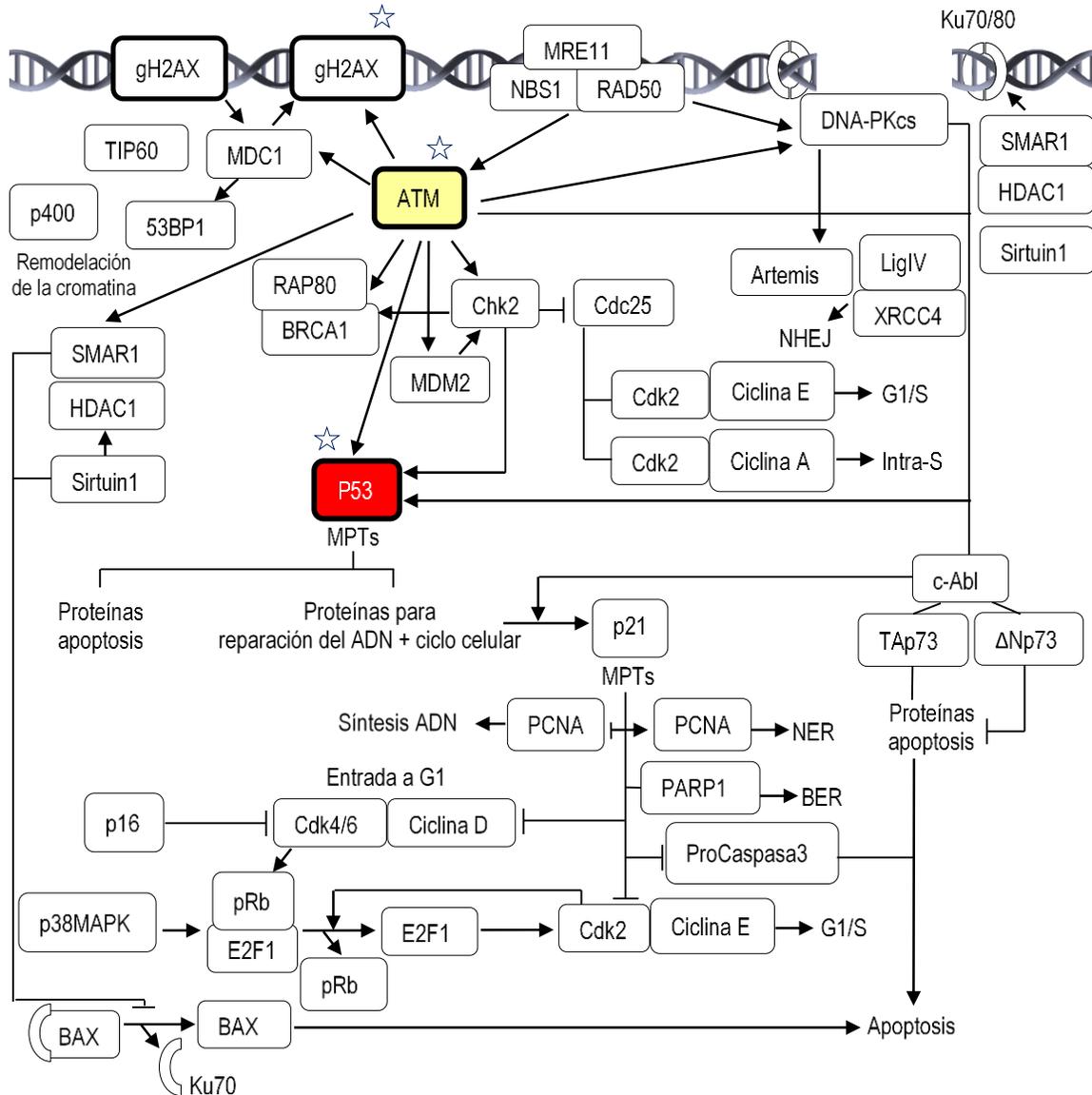


Figura 14. Respuesta al daño del ADN por rupturas de doble cadena. A un costado de las proteínas analizadas en este trabajo, se ubica una estrella azul (Modificado de Fielder y cols., 2017).

11.2 PERSPECTIVAS

- Seguramente continuará la identificación de nuevos tipos de MPTs, por lo que una comprensión completa de la regulación epigenética requerirá más estudios para conocer su función y la forma en que se relacionan, de manera sinérgica o antagónica, con las MPTs conocidas para regular las distintas funciones asociadas con ellas.
- Resultará importante analizar cómo cada MPT de manera particular, y en conjunto, puede orientar hacia determinados resultados biológicos.
- El contexto celular, así como los sucesos entre y dentro de las vías de señalización, se deberán tener muy presentes para dilucidar a detalle lo que está ocurriendo.
- Se requerirán estudios posteriores que profundicen respecto a lo que está sucediendo con la proteína P53 en el entorno celular de la desnutrición experimental.

12. REFERENCIAS

- Abdulahi, A., Shab-Bidar, S., Rezaei, S., y Djafarian, K. (2017). Nutritional status of under five children in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Ethiopian Journal of Health Science*, 27(2), 175–188. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v27i2.10>
- Abe, I., Shirato, K., Hashizume, Y., Mitsuhashi, R., Kobayashi, A., Shiono, C., Sato, S., Tachiyashiki, K., e Imaizumi, K. (2013). Folate-deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 18(1), 78–84. <https://doi.org/10.1007/s12199-012-0286-6>
- Adamowicz, M. (2018). Breaking up with ATM. *Journal of Immunological Sciences*, 2(1), 26–31.
- Ahmed-Farid, O. A. H., Nasr, M., Ahmed, R. F., y Bakeer, R. M. (2017). Beneficial effects of curcumin nano-emulsion on spermatogenesis and reproductive performance in male rats under protein deficient diet model: Enhancement of sperm motility, conservancy of testicular tissue integrity, cell energy and seminal plasma amino acids content. *Journal of Biomedical Science*, 24(66), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0373-5>
- Anand, R., Jasrotia, A., Bundschuh, D., Howard, S. M., Ranjha, L., Stucki, M., y Cejka, P. (2019). NBS1 promotes the endonuclease activity of the Mre11-Rad50 complex by sensing CtIP phosphorylation. *The EMBO Journal*, 38(7), 1–16. <https://doi.org/10.15252/emj.2018101005>

- Antoniani, C., Romano, O., y Miccio, A. (2017). Concise review: Epigenetic regulation of hematopoiesis: Biological insights and therapeutic applications. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), 2106–2114. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0192>
- Arakawa, H. (2019). Sensorimotor developmental factors influencing the performance of laboratory rodents on learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 375(112140). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112140>
- Arakawa, H., e Iguchi, Y. (2018). Ethological and multi-behavioral analysis of learning and memory performance in laboratory rodent models. *Neuroscience Research*, 135, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.02.001>
- Bae, S.-C., Kolinjivadi, A. M., e Ito, Y. (2019). Functional relationship between p53 and RUNX proteins. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(3), 224–230. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy076>
- Bajinskis, A., Natarajan, A. T., Erixon, K., y Harms-Ringdahl, M. (2013). DNA double strand breaks induced by the indirect effect of radiation are more efficiently repaired by non-homologous end joining compared to homologous recombination repair. *Mutation Research*, 756(1–2), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.012>
- Barbosa, A. S. A. A., Diório, S. M., Pedrini, S. C. B., Nunes, A. J. F., Belone, A. D. F. F., Silva, S. M. U. R., Sartori, B. G. C., Calvi, S. A., Regina, V.-M. F., y Pereira, P. C. M. (2015). The relevance of nutritional status and histopathological findings on the infectious process of BALB/C mice inoculated with *Lacazia*

- loboi. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57(5), 421–426.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500009>
- Batenburg, N. L., Walker, J. R., Noordermeer, S. M., Moatti, N., Durocher, D., y Zhu, X.-D. (2017). ATM and CDK2 control chromatin remodeler CSB to inhibit RIF1 in DSB repair pathway choice. *Nature Communications*, 8, 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02114-x>
- Batis, C., Denova-Gutiérrez, E., Estrada-Velazco, B. I., y Rivera, J. (2020). Malnutrition prevalence among children and women of reproductive age in Mexico by wealth, education level, urban/rural area and indigenous ethnicity. *Public Health Nutrition*, 1–12. <https://doi.org/10.1017/S1368980019004725>
- Batrouni, L. (2016). *Evaluación nutricional* (1a edición). Brujas.
- Berger, D. N., Stanley, F. K. T., Moore, S., y Goodarzi, A. A. (2017). ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1731), 1–14. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0283>
- Betancourt, M., Balvanera, P., y Ortiz, R. (1986). Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone-marrow cells of severely malnourished animals during early life. *Mutation Research Letters*, 175(1), 29–31.
[https://doi.org/10.1016/0165-7992\(86\)90141-7](https://doi.org/10.1016/0165-7992(86)90141-7)
- Betancourt, M., Cortés, E., Pérez-Vera, P., González, C., y Ortiz, R. (2005). Assessment of DNA damage in brain, liver, kidney and testis from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(1), 79–83.

- Betancourt, R. M., Ortiz, M. R., González, T. C., Pérez, P., Cortés, L., Rodríguez, C. L., y Villaseñor, L. (1995). Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 331(1), 65–77. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00052-K](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00052-K)
- Bian, L., Meng, Y., Zhang, M., y Li, D. (2019). Mre11-Rad50-Nbs1 complex alterations and DNA damage response: Implications for cancer treatment. *Molecular Cancer*, 18(169), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1100-5>
- Blackford, A. N., y Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the DNA damage response. *Molecular Cell*, 66(6), 801–817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Favianoba, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., ... Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625–631. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marci, E., Suski, J. M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M. R., y Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling*, 8(3), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>

- Borelli, P., Barros, F. E. V., Nakajima, K., Blatt, S. L., Beutler, B., Pereira, J., Tsujita, M., Favero, G. M., y Fock, R. A. (2009). Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(6), 523–530. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000600008>
- Bowen, M. E., y Attardi, L. D. (2019). The role of p53 in developmental syndromes. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(3), 200–211. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy087>
- Burrows, N., y Maxwell, P. H. (2017). Hypoxia and B cells. *Experimental Cell Research*, 356(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.019>
- Cai, Y. N., Liu, J. Y., Hu, R., Zhang, Q. H., Dai, Z. M., Qiao, Y. J., y Dai, X. H. (2015). The determinations of nucleosome positioning. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(14), 2651–2665.
- Campos, A., y Clemente-Blanco, A. (2020). Cell cycle and DNA repair regulation in the damage response: Protein phosphatases take over the reins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(446), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms21020446>
- Carr, A. C., y Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>
- Carranza, D., Vega, A. K., Torres-Rusillo, S., Montero, E., Martínez, L. J., Santamaría, M., Santos, J. L., y Molina, I. J. (2017). Molecular and functional characterization of a cohort of spanish patients with Ataxia-Telangiectasia.

Neuromolecular Medicine, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8440-8>

Carroll, G. J., Lama, S. D., Martinez-Brockman, J. L., y Pérez-Escamilla, R. (2017). Evaluation of nutrition interventions in children in conflict zones: A narrative review. *Advances in Nutrition*, 8(5), 770–779. <https://doi.org/10.3945/an.117.016121>

Cervantes-Ríos, E., Ortiz, M. R., Martínez-Hernández, A. L., Rojo-Cabrera, L., Graniel-Guerrero, J., y Rodríguez, C. L. (2012). Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 731(1–2), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.11.006>

Cervantes-Ríos, E., Rodríguez, C. L., Graniel-Guerrero, J., y Ortiz, M. A. R. (2014). Evaluación de la frecuencia y tipo de micronúcleos en niños con desnutrición moderada y grave. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30, 23–35.

Chinen, J., y Shearer, W. T. (2010). Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S195–S203. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.040>

Claus, M., Dychus, N., Ebel, M., Damaschke, J., Maydych, V., Wolf, O. T., Kleinsorge, T., y Watzl, C. (2016). Measuring the immune system: A comprehensive approach for the analysis of immune functions in humans. *Archives of Toxicology*, 90, 2481–2495. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1809-5>

- Cohen, S., Danzaki, K., y Maclver, N. J. (2017). Nutritional effects on T-cell immunometabolism. *European Journal of Immunology*, 47(2), 225–235.
- Cortés, B. E., González, T. C., Betancourt, R. M., y Ortiz, M. R. (2001). Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 21(3), 231–247. <https://doi.org/10.1002/tcm.1012>
- Cortés-Barberena, E., Ceballos-Olvera, I., González-Márquez, H., y Ortiz-Muñiz, R. (2013). Moderate and severe malnutrition alters proliferation of spleen cells in rats. *Cell Proliferation*, 46(2), 164–171. <https://doi.org/10.1111/cpr.12019>
- Cortés-Barberena, E., González-Márquez, H., Gómez-Olivares, J. L., y Ortiz-Muñiz, R. (2008). Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clinical & Experimental Immunology*, 152(3), 585–592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03649.x>
- Corujo, D., y Buschbeck, M. (2018). Post-translational modifications of H2A histone variants and their role in cancer. *Cancers*, 10(59), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers10030059>
- Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 185–189. <https://doi.org/10.1038/nri3803>
- de Moraes, N. G., da Costa, T. B., Ferreira, de L. L. F., Basílio, dos S. D., de Moraes, N. N. G., de Pavia, C. M., Pereira, V. R. A., y de Castro, B. C. M. M. (2019). Impact of neonatal malnutrition on expression TLR-9, NF-kB and cytokines of

macrophages infected in vitro with methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.
Microbial Pathogenesis, 132, 254–260. [https://doi.org/10.1016 / j.micpath.2019.05.009](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.009)

de Oliveira, D. C., Hastreiter, A. A., Mello, A. S., de Oliveira, B. J. S., Oliveira, S. E. W. C., Borelli, P., y Fock, R. A. (2014). The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-κB expression via the TNF-α signaling pathway. *Cytokine*, 69(2), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.06.004>

Dezorella, N., Kay, S., Baron, S., Shapiro, M., Porat, Z., Deutsch, V., Herishanu, Y., y Katz, B.-Z. (2015). Measurement of lymphocyte aggregation by flow cytometry—physiological implications in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B. Clinical Cytometry*, 90B, 257–266. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21263>

Di Sotto, A., Di Giacomo, S., Rubini, E., Macone, A., Gulli, M., Mammola, C. L., Eufemi, M., Mancinelli, R., y Mazzanti, G. (2020). Modulation of STAT3 signaling, cell redox defenses and cell cycle checkpoints by β-caryophyllene in cholangiocarcinoma cells: Possible mechanisms accounting for doxorubicin chemosensitization and chemoprevention. *Cells*, 9(4), 1–34. <https://doi.org/10.3390/cells9040858>

Duarte-Neto, A. N., Croda, J., Pagliari, C., Garcia, S. F., Nicodemo, A. C., y Seixas, D. M. I. (2019). Severe leptospirosis features in the spleen indicate cellular immunosuppression similar to that found in septic shock. *Frontiers in Immunology*, 10(920), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00920>

- Elsayh, K. I., Sayed, D. M., Zahran, A. M., y Saad, K. (2013). Effects of pneumonia and malnutrition on the frequency of micronuclei in peripheral blood of pediatric patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(10), 942–950.
- Engeland, K. (2018). Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 114–132. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.172>
- Falck, J., Coates, J., y Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434, 605–611. <https://doi.org/10.1038/nature03442>
- FAO. (2019). *Evaluación del programa de la FAO en México 2013-2018* (Evaluaciones de Los Programas En Los Países, pp. 1–23). <http://www.fao.org/3/ca5609es/ca5609es.pdf>
- FAO, FIDA, OMS, PMA, y UNICEF. (2019). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2019. Protegerse frente a la desaceleración y el debilitamiento de la economía* (El Estado Del Mundo, pp. 1–256). <http://www.fao.org/3/ca5162es/ca5162es.pdf>
- Fielder, E., von Zglinicki, T., y Jurk, D. (2017). The DNA damage response in neurons: Die by apoptosis or survive in a senescence-like state? *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(1), S107–S131. <https://doi.org/10.3233/JAD-161221>
- Fock, R. A., Vinolo, M. A., Blatt, S. L., y Borelli, P. (2012). Impairment of the hematological response and interleukin-1 β production in protein-energy malnourished mice after endotoxemia with lipopolysaccharide. *Brazilian*

Journal of Medical and Biological Research, 45(12), 1163–1171.

<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500151>

Franzago, M., Fraticelli, F., Stuppia, L., y Vitacolonna, E. (2019). Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: Consequences in mother and child.

Epigenetics, 14(3), 215–235. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1582277>

Fujinami, M., Kondo, H., Yufu, K., Shinohara, T., Ishii, Y., Teshima, Y., Nakagawa,

M., y Takahashi, N. (2018). Association between the baseline peripheral blood monocyte counts, the size of spleen, and the response to cardiac

resynchronization therapy. *Journal of Cardiology*, 71(3), 299–304.

<https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2017.09.004>

Gangadharan, A., Choi, S. E., Hassan, A., Ayoub, N. M., Durante, G., Balwani, S.,

Kim, Y. H., Pecora, A., Goy, A., y Suh, K. S. (2017). Protein calorie malnutrition, nutritional intervention and personalized cancer care. *Oncotarget*,

8(14), 24009–24030. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15103>

Gavish-Izakson, M., Velpula, B. B., Elkon, R., Prados-Carvajal, R., Barnabas, G. D.,

Ugalde, A. P., Agami, R., Geiger, T., Huertas, P., Ziv, Y., y Shiloh, Y. (2018).

Nuclear poly(A)-binding protein 1 is an ATM target and essential for DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Research*, 46(2), 730–747.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1240>

Georgoulis, A., Vorgias, C. E., Chrousos, G. P., y Rogakou, E. P. (2017). Genome

instability and γ H2AX. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1–

10. <https://doi.org/10.3390/ijms18091979>

- Gómez, F. S. (1946). Desnutrición. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 3, 543–551.
- Gómez-Meda, B. C., Bañales-Martínez, L. R., Zamora-Pérez, A. L., Lemus-Varela, M. de L., Trujillo, X., Sánchez-Parada, M. G., Torres-Mendoza, B. M., Armendáriz-Borunda, J., y Zúñiga-González, G. M. (2016). Micronucleated erythrocytes in peripheral blood from neonate rats exposed by breastfeeding to cyclophosphamide, colchicine, or cytosine-arabioside. *Biomed Research International*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/9161648>
- González, C., Nájera, O., Cortés, B. E., Toledo, G., López, L., Betancourt, R. J. M., y Ortiz, M. R. (2002a). Hydrogen peroxide–induced DNA damage and DNA repair in lymphocytes from malnourished children. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39, 33–42. <https://doi.org/10.1002/em.10038>
- González, C., Nájera, O., Cortés, B. E., Toledo, G., López, L., Betancourt, R. J. M., y Ortiz, M. R. (2002b). Susceptibility to DNA damage induced by antibiotics in lymphocytes from malnourished children. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 22, 147–158.
- Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G. J. M., van der Meer, J. W. M., Conrath, U., y Netea, M. G. (2018). Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunological Reviews*, 283(1), 21–40. <https://doi.org/10.1111/imr.12647>
- Govaert, E., Van Steendam, K., Scheerlinck, E., Vossaert, L., Meert, P., Stella, M., Willems, S., De Clerck, L., Dhaenens, M., y Deforce, D. (2016). Extracting histones for the specific purpose of label-free MS. *Proteomics*, 16(23), 2937–2944. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600341>

- Guleria, A., y Chandna, S. (2016). ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA Repair*, 39, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.12.009>
- Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., y Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 199–210. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>
- Hashimoto, N., Nagano, H., y Tanaka, T. (2019). The role of tumor suppressor p53 in metabolism and energy regulation, and its implication in cancer and lifestyle-related diseases. *Endocrine Journal*, 66(6), 485–496. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ18-0565>
- Hastreiter, A. A., Makiyama, E. N., Borelli, P., y Fock, R. A. (2019). Protein malnutrition impairs bone marrow endothelial cells affecting hematopoiesis. *Nutrition*, 69, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.06.021>
- Haupt, S., Mejía-Hernández, J. O., Vijayakumaran, R., Keam, S. P., y Haupt, Y. (2019). The long and the short of it: The MDM4 tail so far. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(3), 231–244. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz007>
- Hendricks, J., Visser, A., Dammers, P. M., Burgerhof, J. G. M., Bos, N. A., y Kroese, F. G. M. (2019). The formation of mutated IgM memory B cells in rat splenic marginal zones is an antigen dependent process. *PLoS One*, 14(9), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220933>
- Ho, V., Chung, L., Singh, A., Lea, V., Abubakar, A., Lim, S. H., Ng, W., Lee, M., de Souza, P., Shin, J.-S., y Lee, C. S. (2018). Overexpression of the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex in rectal cancer correlates with poor response to

- neoadjuvant radiotherapy and prognosis. *BMC Cancer*, 18(869), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4776-9>
- Horn, S., Brady, D., y Prise, K. (2015). Alpha particles induce pan-nuclear phosphorylation of H2AX in primary human lymphocytes mediated through ATM. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(10), 2199–2206. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.06.010>
- Hu, Y., Maisey, K., Subramani, P. A., Liu, F., Flores-Kossack, C., Imarai, M., Secombes, C. J., y Wang, T. (2018). Characterisation of rainbow trout peripheral blood leucocytes prepared by hypotonic lysis of erythrocytes, and analysis of their phagocytic activity, proliferation and response to PAMPs and proinflammatory cytokines. *Developmental & Comparative Immunology*, 88, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.07.010>
- Huang, L.-H., Lin, P.-H., Tsai, K.-W., Wang, L.-J., Huang, Y.-H., Kuo, H.-C., y Li, S.-C. (2017). The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One*, 12(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184692>
- Hyka-Nouspikel, N., Lemonidis, K., Lu, W.-T., y Nouspikel, T. (2011). Circulating human B lymphocytes are deficient in nucleotide excision repair and accumulate mutations upon proliferation. *Blood*, 117(23), 6277–6286. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326637>
- Ibrahim, M. K., Zambruni, M., Melby, C. L., y Melby, P. C. (2017). Impact of childhood malnutrition on host defense and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 919–971. <https://doi.org/10.1128/CMR.00119-16>

- INEGI, INSP, y SSA. (2019). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018* (pp. 1–42).
https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- INSP. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Resultados destacados* (pp. 1–30).
http://smsp.org.mx/docs/LXXII_ponencias/ensanut_2016_resultados.pdf
- Junt, T., Scandella, E., y Ludewig, B. (2008). Form follows function: Lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nature Reviews Immunology*, 8, 764–775. <https://doi.org/10.1038/nri2414>
- Karakostis, K., Vadivel, G. S., López, I., Thermou, A., Wang, L., Nylander, K., Olivares-Illana, V., y Fåhræus, R. (2019). A single synonymous mutation determines the phosphorylation and stability of the nascent protein. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(3), 187–199. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy049>
- Khairallah, M.-T., Astroski, J., Custer, S. K., Androphy, E. J., Franklin, C. L., y Lorson, C. L. (2017). SMN deficiency negatively impacts red pulp macrophages and spleen development in mouse models of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 26(5), 932–941. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx008>
- Khan, S., Zaheer, S., y Safdar, N. F. (2019). Determinants of stunting, underweight and wasting among children <5 years of age: Evidence from 2012-2013 Pakistan demographic and health survey. *BMC Public Health*, 19(358), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6688-2>

- Koethe, J. R., y von Reyn, C. F. (2016). Protein-calorie malnutrition, macronutrient supplements, and tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(7), 857–863. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0936>
- Koyama, M., y Kurumizaka, H. (2018). Structural diversity of the nucleosome. *The Journal of Biochemistry*, 163(2), 85–95. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx081>
- Kumar, V. (2018). T cells and their immunometabolism: A novel way to understanding sepsis immunopathogenesis and future therapeutics. *European Journal of Cell Biology*, 97(6), 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.05.001>
- Kurashige, T., Shimamura, M., y Nagayama, Y. (2016). Differences in quantification of DNA double-strand breaks assessed by 53BP1/γH2AX focus formation assays and the comet assay in mammalian cells treated with irradiation and N-acetyl-L-cysteine. *Journal of Radiation Research*, 57(3), 312–317. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw001>
- Lafrance-Vanasse, J., Williams, G. J., y Trainer, J. A. (2015). Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 117, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.004>
- Laurenti, E., y Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 553(7689), 418–426.
- Lazare, S. S., Wojtowicz, E. E., Bystrykh, L. V., y de Haan, G. (2014). MicroRNAs in hematopoiesis. *Experimental Cell Research*, 329(2), 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.033>

- Lebailly, P., Mirey, G., Herin, F., Lecluse, Y., Salles, B., y Boutet-Robinet, E. (2015). DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying season. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 88(7), 963–972. <https://doi.org/10.1007/s00420-015-1024-3>
- Ledderose, C., Bao, Y., Lidicky, M., Zipperle, J., Li, L., Strasser, K., Shapiro, N. I., y Junger, W. G. (2014). Mitochondria are gate-keepers of T cell function by producing the ATP that drives purinergic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), 25936–25945. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.575308>
- Lee, J.-H., y Paull, T. T. (2020). Mitochondria at the crossroads of ATM-mediated stress signaling and regulation of reactive oxygen species. *Redox Biology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101511>
- Lieschke, E., Wang, Z., Kelly, G. L., y Strasser, A. (2019). Discussion of some “knowns” and some “unknowns” about the tumour suppressor p53. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(3), 212–223. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy077>
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., y Feng, Z. (2019). Tumor suppressor p53 and metabolism. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(4), 284–292. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy070>
- Liyanage, V. R. B., Jarmasz, J. S., Murugesan, N., del Bigio, M. R., Rastegar, M., y Davie, J. R. (2014). DNA modifications: Function and applications in normal and disease states. *Biology*, 3(4), 670–723. <https://doi.org/10.3390/biology3040670>
- Lulijwa, R., Alfaro, A. C., Merien, F., Meyer, J., y Young, T. (2019). Advances in salmonid fish immunology: A review of methods and techniques for lymphoid

- tissue and peripheral blood leucocyte isolation and application. *Fish & Shellfish Immunology*, 95, 44–80. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.006>
- Márquez-Mota, C. C., Rodríguez-Gaytán, C., Adjibade, P., Mazroui, R., Gálvez, A., Granados, O., Tovar, A., y Torres, N. (2016). The mTORC1-signaling pathway and hepatic polyribosome profile are enhanced after the recovery of a protein restricted diet by a combination of soy or black bean with corn protein. *Nutrients*, 8(9), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu8090573>
- Mebius, R. E., y Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5, 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Mello, A. S., de Oliveira, D. C., Bizarro, B., Sá-Nunes, A., Hastreiter, A. A., Soares de Oliveira, J. B., Xavier, J. G., Borelli, P., y Fock, R. A. (2014). Protein malnutrition alters spleen cell proliferation and IL-2 and IL-10 production by affecting the STAT-1 and STAT-3 balance. *Inflammation*, 37(6), 2125–2138. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9947-5>
- Mikkelsen, K., Prakash, M. D., Kuol, N., Nurgali, K., Stojanovska, L., y Apostolopoulos, V. (2019). Anti-Tumor Effects of Vitamin B2, B6 and B9 in Promonocytic Lymphoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms20153763>
- Min, S., Kim, K., Kim, S.-G., Cho, H., y Lee, Y. (2018). Chromatin-remodeling factor, RSF1, controls p53-mediated transcription in apoptosis upon DNA strand breaks. *Cell Death & Disease*, 9(1079), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1128-2>

- Moeglin, E., Desplancq, D., Conic, S., Oulad-Abdelghani, M., Stoessel, A., Chipier, M., Vigneron, M., Didier, P., Tora, L., y Weiss, E. (2019). Uniform widespread nuclear phosphorylation of histone H2AX is an indicator of lethal DNA replication stress. *Cancers*, 11(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers11030355>
- Molina-Serrano, D., Kyriakou, D., y Kirmizis, A. (2019). Histone modifications as an intersection between diet and longevity. *Frontiers in Genetics*, 10(192), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00192>
- Molz, P., Ellwanger, J. H., Zenkner, F. F., de Campos, D., Prá, D., Putzke, M. T. L., y Franke, S. I. R. (2016). Recognition memory and DNA damage in undernourished young rats. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 88(3), 1863–1873. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150608>
- Mora-Castilla, S., Tejedro, J. R., Hmadcha, A., Cahuana, G. M., Martín, F., Soria, B., y Bedoya, F. J. (2010). Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell Death & Differentiation*, 17, 1025–1033. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.204>
- Müller, L., Di Benedetto, S., y Pawelec, G. (2019). The immune system and its dysregulation with aging. In *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science* (Vol. 91, pp. 21–43). https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-981-13-3681-2_2#citeas
- Napoli, M., y Flores, E. R. (2020). The p53 family reaches the final frontier: The variegated regulation of the dark matter of the genome by the p53 family in cancer. *RNA Biology*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1710054>

- Netea, M. G., y van der Meer, J. W. M. (2017). Trained immunity: An ancient way of remembering. *Cell Host & Microbe*, 21(3), 297–300. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.003>
- Nie, C., He, T., Zhang, W., Zhang, G., y Ma, X. (2018). Branched chain amino acids: Beyond nutrition metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(954), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms19040954>
- Niedernhofer, L. J., Gurkar, A. U., Wang, Y., Vijg, J., Hoeijmakers, J. H. J., y Robbins, P. D. (2018). Nuclear genomic instability and aging. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 295–322. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012239>
- Nobili, L., Lionetti, M., y Neri, A. (2016). Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Oncotarget*, 7(31), 50666–50681. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9308>
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., y Nakamura, Y. (2000). P53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102(6), 849–862. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00073-8)
- OMS. (2010). *La alimentación del lactante y del niño pequeño: Capítulo modelo para libros de texto dirigidos a estudiantes de medicina y otras ciencias de la salud* (pp. 1–120). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44310/9789275330944_spa.pdf?sequence=1

- Ortiz, M. R., Cortés, L., González, T. C., López, L., Pérez, P., Cortés, B. E., y Betancourt, R. M. (1997). Analysis of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30(4), 363–370. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)30:4<363::AID-EM1>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:4<363::AID-EM1>3.0.CO;2-K)
- Ortiz, R., Campos, C., Gómez, J. L., Espinoza, M., Ramos-Motilla, M., y Betancourt, M. (1994). Sister-chromatid exchange (SCE) and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition (PCM). *Mutation Research*, 312(1), 33–37. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90006-x](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90006-x)
- Ortiz, R., Cortés, E., González, C., Pérez, L., y Betancourt, M. (1995). Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26(1), 55–59. <https://doi.org/10.1002/em.2850260108>
- Ortiz, R., Cortés, E., González, C., Perez, L., y Betancourt, M. (1996). Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Medical Science Research*, 24, 843–846.
- Ortiz, R., Medina, H., Cortés, E., Cervantes, E., y Rodríguez, L. (2011). Trimethoprim-sulfamethoxazole increase micronuclei formation in peripheral blood from weanling well-nourished and malnourished rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(8), 673–680. <https://doi.org/10.1002/em.20670>
- Ortiz, R., Medina, H., Rodríguez, L., González-Márquez, H., y Cortés, E. (2004). Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood

- reticulocytes from severely malnourished rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43, 179–185. <https://doi.org/10.1002/em.20009>
- Ou, H.-L., y Schumacher, B. (2018). DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood*, 131(5), 488–495. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-746396>
- Ozaki, T., Nakamura, M., y Shimozato, O. (2015). Novel implications of DNA damage response in drug resistance of malignant cancers obtained from the functional interaction between p53 family and RUNX2. *Biomolecules*, 5(4), 2854–2876. <https://doi.org/10.3390/biom5042854>
- Palla, V.-V., Karaolani, G., Katafigiotis, I., Anastasiou, I., Patapis, P., Dimitroulis, D., y Perrea, D. (2017). Gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? *Tumor Biology*, 39(3), 1–11. <https://doi.org/10.1177/1010428317695931>
- Pashayee-khamene, F., Saber-firoozi, M., Hatami, B., Rashidkhani, B., Aghamohammadi, V., Mohammadi, E., y Herkmatdoost, A. (2019). Food groups intake of cirrhotic patients, comparison with the nutritional status and disease stage. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 12(3), 226–232.
- Pateras, I. S., Havaki, S., Nikitopoulou, X., Vougas, K., Townsend, P. A., Panayiotidis, M. I., Georgakilas, A. G., y Gorgoulis, V. G. (2015). The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? Nature decides when and where. *Pharmacology & Therapeutics*, 154, 36–56. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.06.011>

- Paull, T. T. (2015). Mechanisms of ATM activation. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>
- Pereyra-Venegas, J., Segura-Alegría, B., Guadarrama-Olmos, J., Mariscal-Tovar, S., Quiróz-González, S., y Jiménez-Estrada, I. (2015). Effects provoked by chronic undernourishment on the fibre type composition and contractility of fast muscles in male and female developing rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(5), 974–986. <https://doi.org/10.1111/jpn.12274>
- Pernes, G., Flynn, M. C., Lancaster, G. I., y Murphy, A. J. (2019). Fat for fuel: Lipid metabolism in haematopoiesis. *Clinical & Translational Immunology*, 8(12), 1–16. <https://doi.org/10.1002/cti2.1098>
- Pitolli, C., Wang, Y., Candi, E., Shi, Y., Melino, G., y Amelio, I. (2019). p53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms. *Cancers*, 11(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cancers11121983>
- Qin, L., Fan, M., Candas, D., Jiang, G., Papadopoulos, S., Tian, L., Woloschak, G., Grdina, D. J., y Li, J. J. (2015). CDK1 enhances mitochondrial bioenergetics for radiation-induced DNA repair. *Cell Reports*, 13(10), 2056–2063. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.015>
- Rasko, J. E. J., y Wong, J. J.-L. (2017). Nuclear microRNAs in normal hemopoiesis and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 10, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0375-x>
- Redon, C. E., Weyemi, U., Parekh, P. R., Huang, D., Burrell, A. S., y Bonner, W. M. (2012). γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Regulatory Mechanisms, 1819(7), 743–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.021>

Remmers, F., Schreuder, M. F., Gemke, R. J. B. J., y Delemarre-van de Waal, H. A. (2008). Energy intake and resting energy expenditure in adult male rats after early postnatal food restriction. *British Journal of Nutrition*, 99(5), 1149–1156. <https://doi.org/10.1017/S0007114507843546>

Ruiz-Rosado, A., Cabrera-Fuentes, H. A., González-Calixto, C., González-López, L., Cázares-Raga, F. E., Segura-Alegría, B., Lochnit, G., Hernández-Hernández, F. de la C., Preissner, K. T., y Jiménez-Estrada, I. (2013). Influence of chronic food deprivation on structure-function relationship of juvenile rat fast muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 34, 357–368. <https://doi.org/10.1007/s10974-013-9357-6>

Sabapathy, K., y Lane, D. P. (2019). Understanding p53 functions through p53 antibodies. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(4), 317–329. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz010>

Saito, Y., Zhou, H., y Kobayashi, J. (2015). Chromatin modification and NBS1: Their relationship in DNA double-strand break repair. *Genes & Genetic Systems*, 90, 195–208. <https://doi.org/10.1266/ggs.15-00010>

Salameh, E., Morel, F. B., Zeilani, M., Déchelotte, P., y Marion-Letellier, R. (2019). Animal models of undernutrition and enteropathy as tools for assessment of nutritional intervention. *Nutrients*, 11(2233), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu11092233>

- Santos, E. W., Oliveira, D. C., Silva, G. B., Tsujita, M., Beltran, J. O., Hastreiter, A., Fock, R. A., y Borelli, P. (2017). Hematological alterations in protein malnutrition. *Nutrition*, 75(11), 909–919. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux041>
- Satoh, T., Oikawa, H., Yashima-Abo, A., Nishiya, M., y Masuda, T. (2019). Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 on the reticular framework between white pulp and the marginal zone in the human spleen. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 59(4), 187–195. <https://doi.org/10.3960/jslrt.19032>
- Schulz, O., Hammerschmidt, S. I., Moschovakis, G. L., y Förster, R. (2016). Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annual Reviews of Immunology*, 34, 203–242. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055649>
- Semba, R. D., Shardell, M., Ashour, F. A. S., Moaddel, R., Trehan, I., Maleta, K. M., Ordiz, M. I., Kraemer, K., Khadeer, M. A., Ferrucci, L., y Manary, M. J. (2016). Child stunting is associated with low circulating essential amino acids. *EBioMedicine*, 6, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.030>
- Serrano-Benítez, A., Cortés-Ledesma, F., y Ruiz, J. F. (2020). “An end to a means”: How DNA-end structure shapes the double-strand break repair process. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(153), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00153>
- Shibata, A., y Jeggo, P. (2018). ATM: Its recruitment, activation, signalling and contribution to tumour suppression. In *Targeting the DNA damage response*

for anti-cancer therapy (pp. 129–154). Humana Press, Cham.

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-75836-7_6#citeas

Situ, Y., Chung, L., Lee, C. S., y Ho, V. (2019). MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) complex in human cancer and prognostic implications in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 1–11.

<https://doi.org/10.3390/ijms20040816>

Stagni, V., Oropallo, V., Fianco, G., Antonelli, M., Cinà, I., y Barilà, D. (2014). Tug of war between survival and death: Exploring ATM function in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 5388–5409.

<https://doi.org/10.3390/ijms15045388>

Stingele, J., Bellelli, R., y Boulton, S. J. (2017). Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 563–573.

<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.56>

Syed, A., y Tainer, J. A. (2018). The Mre11–Rad50–Nbs1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 263–294.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012415>

Tan, H., Yang, K., Li, Y., Shaw, T. I., Wang, Y., Blanco, D. B., Wang, X., Cho, J.-H., Wang, H., Rankin, S., Guy, C., Peng, J., y Chi, H. (2017). Integrative proteomics and phosphoproteomics profiling reveals dynamic signaling networks and bioenergetics pathways underlying T cell activation. *Immunity*, 46(3), 488–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.010>

- Tan, Y. S., Mhoumadi, Y., y Verma, C. S. (2019). Roles of computational modelling in understanding p53 structure, biology, and its therapeutic targeting. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(4), 306–316. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz009>
- Tanaka, T., Kajstura, M., Halicka, H. D., Traganos, F., y Darzinkiewicz, Z. (2007). Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes. *Cell Proliferation*, 40(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00417.x>
- Tang, S., Hou, Y., Zhang, H., Tu, G., Yang, L., Sun, Y., Lang, L., Tang, X., Du, Y., Zhou, M., Yu, T., Xu, L., Wen, S., Liu, C., y Liu, M. (2015). Oxidized ATM promotes abnormal proliferation of breast CAFs through maintaining intracellular redox homeostasis and activating the PI3K-AKT, MEK-ERK, and Wnt- β -catenin signaling pathways. *Cell Cycle*, 14(12), 1908–1924. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1041685>
- Thomson, A. K., Somers, E., Powis, R. A., Shorrocks, H. K., Murphy, K., Swoboda, K. J., Gillingwater, T. H., y Parson, S. H. (2017). Survival of motor neurone protein is required for normal postnatal development of the spleen. *Journal of Anatomy*, 230(2), 337–346. <https://doi.org/10.1111/joa.12546>
- Tubbs, A., y Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell*, 168(4), 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002>
- Udayakumar, D., Horikoshi, N., Mishra, L., Hunt, C., y Pandita, T. K. (2015). Detecting ATM-dependent chromatin modification in DNA damage response.

Methods in Molecular Biology, 1288, 317–336. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2474-5_18

Wang, Y., Chen, Y., Chen, Q., Zhang, X., Wang, H., Wang, Z., Wang, J., y Tian, C. (2020). The role of acetylation sites in the regulation of p53 activity. *Moleculalr Biology Reports*, 47, 381–391. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05141-7>

Willard-Mack, C., Elmore, S. A., Hall, W. C., Harleman, J., Kuper, C. F., Losco, P., Rehg, J. E., Rühl-Fehlert, C., Ward, J. M., Weinstock, D., Bradley, A., Satoru, H., Pearse, G., Mahler, B. W., Herbert, R. A., y Keenan, C. M. (2019). Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse hematolymphoid system. *Toxicologic Phatology*, 47(6), 665–783. <https://doi.org/10.1177/0192623319867053>

Williams, A. B., y Schumacher, B. (2016). P53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>

Wu, D., Lewis, E. D., Pae, M., y Meydani, S. N. (2019). Nutritional modulation of immune function: Analysis of evidence, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in Immunology*, 9(3160), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03160>

Xu H., Lauer, F. T., Liu, K. J., Hudson, L. G., y Burchiel, S. W. (2016). Environmentally relevant concentrations of arsenite and monomethylarsonous acid inhibit IL-7/STAT5 cytokine signaling pathways in mouse CD3+CD4-CD8- double negative thymus cells. *Toxicology Letters*, 247, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.02.014>

- Yang, Taehong, y Terman, J. R. (2017). Characterizing PKA-mediated phosphorylation of Plexin using purified proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1493, 147–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6448-2_10
- Yang, Taewoo, Choi, Y., Joh, J. W., Cho, S. K., Kim, D.-S., y Park, S.-G. (2019). Phosphorylation of p53 serine 15 is a predictor of survival for patients with hepatocellular carcinoma. *Canadian Journal of Gastroenterology Hepatology*, 2019, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/9015453>
- Yumine, A., Fraser, S. T., y Sugiyama, D. (2017). Regulation of the embryonic erythropoietic niche: A future perspective. *Blood Research*, 52(1), 10–17. <https://doi.org/10.5045/br.2017.52.1.10>
- Zhao, H., Halicka, H. D., Garcia, J., Li, J., y Darzinkiewicz, Z. (2017). ATM activation and H2AX phosphorylation induced by genotoxic agents assessed by flow- and laser scanning cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 1599, 183–196. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6955-5_14
- Zhu, S., Paydar, M., Wang, F., Li, Y., Wang, L., Barrette, B., Bessho, T., Kwok, B. H., y Peng, A. (2020). Kinesin Kif2C in regulation of DNA double strand break dynamics and repair. *Elife*, 9, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.53402>



Phosphorylated ATM and H2AX in T and B lymphocytes from rats with moderate and severe malnutrition^{☆,☆☆}

Ana María González-Gutiérrez^{a,c}, Rocío Ortiz-Muñoz^a, María del Carmen García-Rodríguez^b, Edith Cortés-Barberena^{a,*}

^a Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186, CP. 09340, CDMX, Mexico

^b Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, AP 9-020, CDMX, Mexico

^c Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Malnutrition
DNA damage
H2AX
ATM
Flow cytometry

ABSTRACT

Protein calorie malnutrition (PCM) occurs when insufficient nutrients are consumed to satisfy the biological needs of an organism. The literature supports the relationship between malnutrition and DNA damage, and among the injuries to genetic material, DNA double-strand breaks (DSBs) are the most dangerous. This study aimed to determine whether the ability of splenic and peripheral blood T and B lymphocytes from nursing rats to recognize DSB-induced DNA damage is affected by PCM. Wistar strain rats were used, and experimental malnutrition was induced by creating food competition during lactation by increasing the number of offspring per wet nurse. Due to its high specificity, the phosphorylated H2AX variant histone assay associated with pATM (Ser1981) combined with flow cytometry was herein used to demonstrate the impact of malnutrition on the DNA damage response. Flow cytometry data indicated that splenic T and B lymphocytes from rats with severe PCM have the capacity to detect genetic material damage, as shown by an increased number of pATM + cells and altered signaling pathway continuity. Collectively, these data suggest that severe malnutrition compromises the continuity of the DNA damage response.

1. Introduction

Protein calorie malnutrition (PCM) develops in an organism as a consequence of insufficient nutrient intake to meet the organism's biological needs [1,2]. PCM occurs frequently during early childhood due to the high requirement of nutrients for adequate growth and development; thus, this age group is the most affected [3,4].

In the literature, several studies involving experimental animals and humans have shown the relationship between PCM and damage to deoxyribonucleic acid (DNA). Betancourt et al. [5] observed a high frequency of exchanges between sister chromatids (SCEs) in rats with severe PCM and detected damage to the genetic material using an alkaline comet assay, finding that damage was the result of serious

infections and subsequent pharmacological treatments in children with second- and third- degree malnutrition [6]. Furthermore, Cortés et al. used an alkaline comet assay to show that severe PCM is associated with DNA damage in the spleen, bone marrow and peripheral blood of rats [7]. In 2013, [8] concluded that poor nutrition followed by accelerated postnatal growth increases oxidative and nitrosative stress and causes DNA damage in rats.

Additionally, a high frequency of micronuclei (MNs) in lymphocytes [9], reticulocytes (RETs) and erythrocytes (E) [10], (with the latter lacking a nucleus, which makes the associated chromatin an unambiguous sign of the presence of MNs), was observed in children with moderate and severe PCM, which was mostly of the clastogenic type [11].

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; DDR, DNA damage response; DSB, double-strand break; E, erythrocytes; gH2AX, variant histone H2AX phosphorylated at Ser139; MN, micronuclei; pATM, ataxia telangiectasia mutated phosphorylated at Ser1981; PCM, protein calorie malnutrition; RET, reticulocyte; SCE, exchange between sister chromatids; UN, undernourished; UNM, moderately undernourished; UNS, severely undernourished; WN, well-nourished

* This Special Issue is edited by "Chennai Guest Editor".

** This article is part of the special issue "DNA Repair & Cancer".

* Corresponding author. Present address at: Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186, CP 09340, CDMX, Mexico.

E-mail addresses: anamglez9@gmail.com (A.M. González-Gutiérrez), arom@xanum.uam.mx (R. Ortiz-Muñoz), carmen.garcia@unam.mx (M.d.C. García-Rodríguez), cobe@xanum.uam.mx (E. Cortés-Barberena).

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102640>

Received 21 December 2018; Received in revised form 15 June 2019; Accepted 1 July 2019

Available online 11 July 2019

1568-7864/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

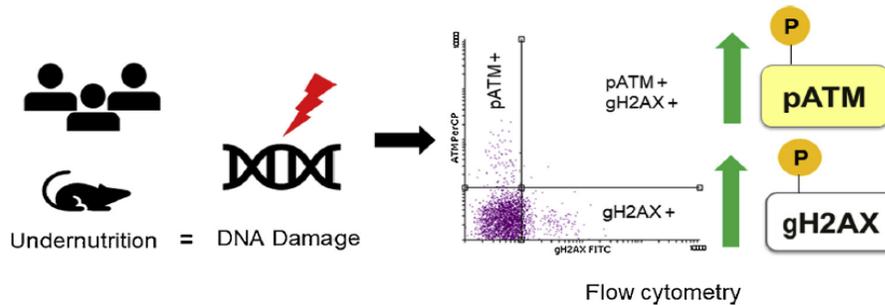


Fig. 1. Background and gH2AX assay by flow cytometry. DNA in humans and experimental animals is damaged as a result of malnutrition. In this work, we used flow cytometry to determine whether the ability to recognize double-strand breaks (DSBs) is affected by protein calorie malnutrition (PCM). The results showed increased cellular percentages that pATM (ataxia telangiectasia mutated, phosphorylated at Ser1981) and the histone variant H2AX phosphorylated at serine 139 (gH2AX); pATM is responsible for phosphorylating gH2AX, which indicates DSBs.

The above changes are related to DNA double-strand breaks (DSBs), the most severe type of cellular damage [12,13]. However, little is known about the impact of malnutrition on the DNA damage response (DDR).

During the DDR, the serine/threonine protein kinase ataxia telangiectasia mutated (ATM) acts as an autophosphorylating damage transducer (active form, pSer1981) [13,14], which in turn phosphorylates the histone variant H2AX at serine 139 (interchangeably called γ -H2AX and gH2AX) [15–17]. The presence of gH2AX is indicative of DNA damage induced by DSBs [18–20] and plays an essential role in DSB detection and repair [19].

In this study, we analyzed the effects of moderate and severe experimental malnutrition on ATM and H2AX phosphorylation in T and B lymphocytes in the spleen and peripheral blood of 21-day-old rats (Fig. 1).

2. Material and methods

2.1. Animals

Wistar rats were used and maintained at the Bioterio of the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I) with a 12–12 h light-dark period (light 07:00–19:00 h) a temperature of 22–25 °C and a 45% relative humidity. Mothers were raised with balanced rodent feed (Abene Bio-Diet-Lab BDL-7100 with 23% protein, Edo. Mex., México) and had free access to water. The experiments were carried out following guidelines certified by the UAM in accordance with the international standards on the use of specimens for experimentation (Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999).

2.1.1. Experimental malnutrition

Malnutrition was induced using the method of feeding competition during lactation. One day after birth, rats were randomly assigned to the well-nourished control group (WN) with 6–8 offspring per nurse or to the undernourished experimental group (UN) with 16 offspring per nurse [21].

The mean body weights of the WN and UN rats were assessed from day 1 until the end of lactation to determine the degree of malnutrition. At 21 days of age, the rats were sacrificed by cervical dislocation, and their peripheral blood and spleen were removed. The average body weight of rats in the WN group was established as the ideal reference weight. The rats in the experimental group were classified according to the weight deficits of the undernourished animals as second degree (UNM, deficit of 26–39.9%) or third degree (UNS, deficit greater than 40%).

2.2. Reagents

The anti-rat CD3-APC (#557030) and CD45RA-PE (#551402) antibodies as well as the BD FACS™ 2 permeabilization solution (10X, #340973) were obtained from BD Biosciences (San José, CA, USA),

anti-H2AX-phosphorylated (Ser139)-FITC (#613404) was purchased from Biogen (San Diego, CA, USA), and the ATM antibody [pSer1981]-PerCP (#NB100306-PCP) was obtained from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA). Heparin (#CAS 9005-49-6) was purchased from MicroLab Laboratories (CDMX, México).

Phosphate buffer (PBS) free of Ca^{2+} and Mg^{2+} (#D5652), ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA disodium, #CAS 6381-92-6) and paraformaldehyde (PFA, #CAS 30525-89-4) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Potassium bicarbonate (KHCO_3 , #CAS 298-14-6) was purchased from MEYER (CDMX, México), and ammonium chloride (NH_4Cl , #CAS 12125-02-9) was obtained from J.T. Baker (Edo. Mex., México). Bovine albumin (#CAS 9048-46-8) was purchased from MP Biomedicals (Aurora, Ohio, USA).

2.3. Sample processing

2.3.1. Flow cytometry

Blood from each rat was obtained with a heparinized syringe, and a 100 μl sample was then added to a polypropylene tube, mixed gently with 2 μl of the CD3 APC antibody and 2 μl of CD45RA PE with the aid of a vortex shaker and incubated for 20 min at 4 °C in the dark. Subsequently, the sample was treated with 2 ml of lysis solution (156 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , and 0.096 mM EDTA disodium), incubated for 10 min and centrifuged at 1300 rpm for 5 min; the supernatant was then aspirated, and the cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS. The mixture was centrifuged again, and the supernatant was discarded. This step was repeated as many times as necessary (approx. 3 times) until the sample lost its red coloration.

Then, 500 μl of 1X BD FACS permeabilizing solution 2 was added to the cells, and the mixture was incubated for 10 min; the supernatant was removed after centrifugation.

The spleen was placed in a Petri dish with PBS and homogenized with the aid of a glass pistil in a small strainer; then, the cells were resuspended in PBS and centrifuged at 1300 rpm for 5 min. The supernatant was removed and filtered with 3 ml of PBS, and the centrifugation step was repeated. Subsequently, the supernatant was discarded, and the cells were resuspended in 1 ml of PBS. Next, 100 μl of the resultant sample mixed gently with 2 μl of the CD3 APC antibody and CD45RA PE and incubated for 20 min at 4 °C in the dark.

Next, the abovementioned blood permeabilization procedure was followed.

2.3.2. Phosphorylated gH2AX and ATM staining

To detect histone gH2AX and protein pATM, after permeabilization, the cells were resuspended in 1 ml of 1% albumin solution in PBS for 30 min. The cells were then recentrifuged, and 5 μl of an anti-gH2AX FITC antibody and 2 μl of an ATM antibody ([pSer1981]-PerCP) were added, mixed gently by vortexing, and allowed to stand under cold and dark conditions for 1 h. Subsequently, another wash was performed, and the cell pellets were resuspended in 50 μl of PBS and fixed with 500 μl of 1% PFA.

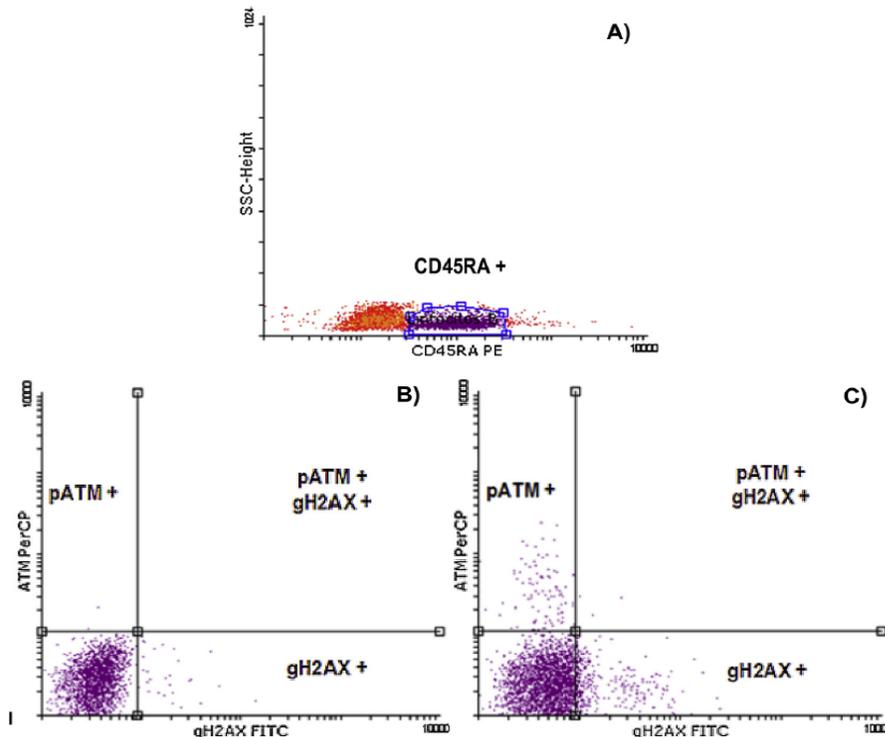


Fig. 2. Analysis strategy. Dot plots are displayed. A: Peripheral blood sample in which the region for the analysis of the cells of interest (B lymphocytes, CD45RA+) is framed; B: integration of the quadrant to establish the cutting region; and C: upper right region, double-positive cells pATM+/gH2AX+; lower right region, phosphorylated H2AX histone-positive cells; and upper left region cells positive for phosphorylated ATM at serine 1981 (pATM).

The samples were read on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) equipped with an argon laser (488 nm excitation) and a red diode laser using the Cell Quest™ Pro version 3.0.1 acquisition program. A total of 20,000 cells per sample were analyzed. The anti-H2AX-phosphorylated (Ser139)-FITC, CD45RA-PE, ATM [pSer1981]-PerCP and CD3-APC signals were detected in channels FL1, FL2, FL3 and FL4, respectively.

2.3.3. Evaluation of the gH2AX and pATM proteins in lymphocytes by flow cytometry

For each experiment, unlabeled cells (autofluorescence) were utilized to calibrate the equipment, and a sample of tissue labeled with CD3-APC and CD45RA-PE was utilized to establish the fluorescence compensation and location of the quadrant (cut region).

Samples analysis was carried out by displaying the dot plots of CD45RA-PE (FL2) vs SSC-H (cellular complexity) to show the positive binding events for this antibody to B lymphocytes (Fig. 2A). The dot plot of gH2AX-FITC (FL1) vs ATM-PerCP (FL3) was created next, which allowed observance of the percentages of the cell population of interest (B lymphocytes, in this case) that were positive in each of the established quadrant regions as follows: upper right region, double-positive cells pATM+/gH2AX+; lower right region, gH2AX+-positive cells; upper left region, cells positive for phosphorylated ATM at serine 1981 (pATM+) (Fig. 2B and C).

For the analysis of T lymphocytes, the same procedure was followed using CD3 APC.

2.4. Statistical analysis

Body and spleen weights are expressed as the mean \pm standard deviation (S. D.) obtained for seven rats in the WN group, eight rats in the experimental UNM group and nine rats in the UNS group. Comparisons between the groups were performed using the Kruskal-

Wallis nonparametric test and Dunn's multiple comparison test with GraphPad Prism software; P values < 0.05 indicated statistically significant differences between groups.

3. Results

3.1. Body and spleen weights

The animals in the UNM and UNS groups weighed significantly less than the those in the WN group, with average deficits of 37.4 and 44.9%, respectively (indicated in Table 1). The splenic weight data are presented in Table 1; low spleen weight was correlated with the degree of malnutrition, as the lowest splenic weight was found in UNS group rats (92.2 mg on average), followed by UNM group rats (mean, 157.6 mg).

3.2. gH2AX and pATM splenic lymphocytes

The percentage of splenic pATM + B lymphocytes in the UNM group was significant increased by 6.8-fold compared with that in the control group. A similar increase in the percentage of double-positive B cells (pATM+/gH2AX+) was also observed, with the UNM group showing a significant 15.7-fold increase compared to the WN group; a similar increase in the percentage of gH2AX + B lymphocytes was observed in the UNM group (3.7-fold compared to the WN group). Moreover, the UNS group exhibited a significant increase (11.7-fold) in the percentage of pATM + B cells compared to that in the WN group. These data are shown in Fig. 3.

The percentage of pATM + splenic T lymphocytes in the UNM group was significantly higher (16.6-fold) than that in the WN group; a similar increase in the percentage of double-positive T cells (pATM+/gH2AX+) was observed in the UNM group, which was significantly increased by 44.4-fold compared to that in the control group. A similar

Table 1

Body and spleen weights of WN rats and rats with moderate (UNM) and severe (UNS) malnutrition. Mean ± S.D. (P ≤ 0.05) significant differences: * vs WN and ** vs UNS.

| | Body weight (g) WN | Spleen (mg) | Body weight (g) UNM | % Deficit | Spleen (mg) | Body weight (g) UNS | % Deficit | Spleen (mg) |
|------|--------------------|-------------|---------------------|-----------|-------------|---------------------|-----------|-------------|
| | 46.1 | 360.0 | 27.6 | 39.5 | 97.0 | 25.2 | 44.8 | 70.0 |
| | 44.7 | 440.0 | 30.9 | 32.3 | 160.0 | 25.1 | 45.0 | 80.0 |
| | 45.1 | 350.0 | 27.7 | 39.3 | 150.0 | 26.9 | 41.1 | 90.0 |
| | 46.7 | 490.0 | 27.6 | 39.5 | 190.0 | 25.7 | 43.7 | 90.0 |
| | 58.8 | 380.0 | 38.9 | 34.2 | 190.0 | 24.0 | 47.4 | 50.0 |
| | 56.5 | 350.0 | 35.9 | 39.3 | 170.0 | 25.3 | 44.6 | 80.0 |
| | 54.5 | 240.0 | 34.4 | 36.4 | 169.0 | 34.2 | 42.2 | 170.0 |
| | | | 33.1 | 38.8 | 135.0 | 29.8 | 44.9 | 120.0 |
| Mean | 50.3 | 372.8 | 32.0 | 37.4** | 157.6 | 26.4 | 51.2 | 80.0 |
| S.D. | 5.7 | 75.5 | 4.1 | 2.7 | 29.7 | 3.0 | 2.8 | 33.5 |

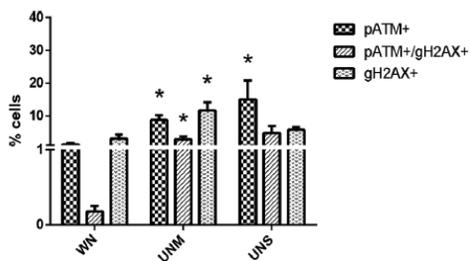


Fig. 3. Splenic B lymphocytes. Percentages of splenic B lymphocytes in the control group (WN, n = 7), moderate malnutrition group (UNM, n = 8), and severe malnutrition group (UNS, n = 9) as determined by flow cytometry. (P ≤ 0.05) indicates significant differences: * vs WN.

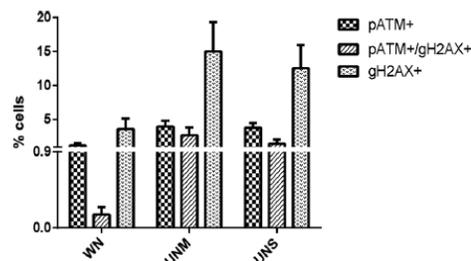


Fig. 5. B lymphocytes in blood. Percentages of B lymphocytes in blood samples from the control group (WN, n = 7), moderate malnutrition group (UNM, n = 8), and severe malnutrition group (UNS, n = 9) as determined by flow cytometry.

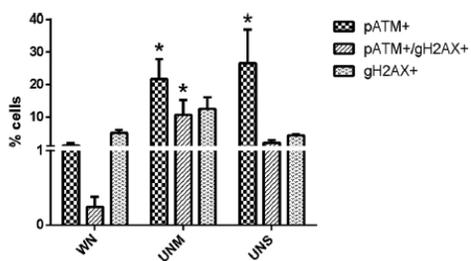


Fig. 4. Splenic T lymphocytes. Percentages of splenic T lymphocytes in the control group (WN, n = 7), moderate malnutrition group (UNM, n = 8), and severe malnutrition group (UNS, n = 9) as determined by flow cytometry. (P ≤ 0.05) indicates significant differences: * vs WN.

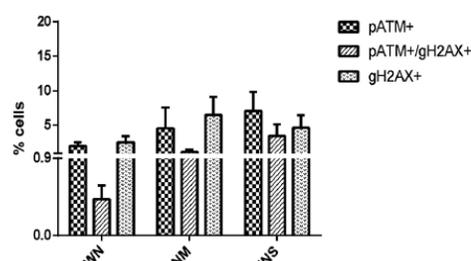


Fig. 6. T lymphocytes in blood. Percentages of T lymphocytes in blood samples from the control group (WN, n = 7), moderate malnutrition group (UNM, n = 8), and severe malnutrition group (UNS, n = 9) as determined by flow cytometry.

increase in the percentage of pATM + T cells was observed in the UNS group (20.3-fold) compared to that in the control group, as indicated in Fig. 4.

3.3. gH2AX and pATM in blood lymphocytes

While the percentages of peripheral blood gH2AX + B and T lymphocytes in both UN groups were higher than those in the control group, the differences were not significant (indicated in Fig. 5); similar findings were observed for the percentages of pATM + B and T lymphocytes. These data are shown in Fig. 6.

4. Discussion

Manipulation of the number of pups per nurse during lactation exerted systemic effects on the growth of malnourished rats, as shown by the reduced body weights presented in Table 1. These data confirm the

efficacy of the experimental model to induce undernutrition established by food competition that we use in our laboratory [21,22].

Body weight is one of the most commonly used indicators in rats for the evaluation of nutritional status in the search for more information about PCM [23]. Although assays for total serum proteins, triglycerides and cholesterol concentrations are also used, for simplicity, the body weight deficit in rats is the best indicator of undernutrition [24]. This deficit is classified as mild (first degree), moderate (second degree) or severe (third degree) according to deficits of 10–25%, 26–39%, and 40% or more, respectively; and the above categories are based on the mean ideal weight of a reference population [25,26]. In this study, UNM and UNS rats were studied. Undernutrition has been linked to alterations of host innate and adaptive immune responses [27].

In PCM, histological changes in the spleen and variations in its weight are observed, as this organ plays an important role in nutritional and infectious processes [23]. In the early stage, this disorder can permanently deteriorate the T and B lymphocyte response, which is

likely occurs by a decrease in due to the decrease expression of proteins that activate these lymphocytes during an infection, as PMC disturbs the synthesis and availability of proteins on which the immune system depends [28]. Importantly, we chose to analyze the spleen because it is a secondary lymphoid organ [29] that is essential for the development of lymphocytes [30] and a site of immune response [31]. In addition, the spleen is part of the hematopoietic system, which is considerably proliferative (and therefore frequently requires a large amount of nutrients) and more vulnerable to damage [32].

The differential results between the spleen and peripheral blood is potentially explainable based on T and B cell proliferation, which is more intense in the spleen than in the peripheral blood, where lymphocytes usually do not proliferate, unless they are activated.

The lymphoid organs, including the spleen, are especially susceptible to structural changes caused by malnutrition, which impairs the functionality of the immune system [30]. In malnourished mice, the proliferative capacity of the spleen is obstructed, the number of pluripotent cells is decreased, genetic material is damaged [33]. The argument for using peripheral blood is that gases and nutrients are exchanged in this tissue [34], and it represents the standard used to surveil immune system cells [35].

To assess DNA damage and genomic instability, the phosphorylated H2AX (gH2AX), comet assay and MN formation assays [36] were used. The first assay (phosphorylation of H2AX using flow cytometry) has several advantages, including its specificity and high sensitivity for recognizing DSBs, even at low frequencies, compared with those of other assays ([19,37]). Exploration of DSBs has mainly been performed in cell lines [20]. Previously, rats were found to represent a useful *in vivo* model for validating γ -H2AX biodosimetry for dose assessment in humans. In addition, the repair kinetics and linear dose responses to gamma rays in rat lymphocytes were similar to those observed in human counterparts [38]. A recent study announced that stress hormones delay DNA repair and promote its accumulation; moreover, DNA damage is considered an important component of wear [39].

ATM has been called a hierarchical kinase, because it has the ability to initiate many pathways simultaneously [40]. Detecting phosphorylated H2AX, which is associated with active ATM, provides a more sensitive assay for genetic material that is considered severely damaged by DSBs [41]. With respect to the phosphorylated gH2AX and ATM proteins, our data show statistically significant increase in the percentage of pATM + B lymphocytes in the splenic tissues of both malnourished groups compared with that in the control group, with increases of 6.8-fold and 11.7-fold in the UNM and UNS groups, respectively.

The percentages of splenic pATM + T cells in both malnourished groups were significantly increased (16.6-fold for UNM and 20.3-fold for UNS) compared with that in the control group. Regarding the percentage of double-positive B cells (pATM + /gH2AX +), the UNM group showed a significant 15.7-fold increase compared to that in the WN group. Importantly, both proteins can be affected in our experimental model, because in mammals, nutrient deficiency affects the rate of protein synthesis in cells and tissues [42], which affects the organism's growth and maturation. These alterations can be extended to organs and systems, and earlier nutritional alterations are correlated with more severe effects [43].

The percentage of double-positive T cells in the UNM group was a significantly increased by 44.4-fold compared to that in the WN group. Moreover, the percentage of splenic gH2AX + B lymphocytes in the UNM group was significantly increased by 3.7-fold compared to that in the control group. The percentages of pATM + B and T lymphocytes in peripheral blood were an increased in both undernourished groups compared to that in the control group, although the differences were not significant. Similar findings were observed for the percentages of double-positive and gH2AX + B and T lymphocytes. These differences between cell populations (T and B cells) in the analyzed tissues (peripheral blood and spleen) could indicate that certain lineages are

protected to a greater extent [44]. In a study by Abe et al., B lymphocytes were shown to be more sensitive to folate deficiency than natural killer (NK) cells and T lymphocytes [45], which may be related to T lymphocytes having a greater capacity for synthesis during DNA damage repair than B lymphocytes as well as differences in the lymphocyte lifetimes [46].

Herein, we demonstrated that UNM and UNS can increase the percentages of rat B and T lymphocytes that are positive for pATM and gH2AX using flow cytometry which indicates effective DNA damage recognition. Previous data indicate that resting B cells repair damaged DNA less efficiently than stimulated B cells [47].

Our laboratory previously observed a high frequency of MN in splenic lymphocytes [29] and RETs in peripheral blood originating from rats with severe malnutrition [22], which could be related to deficiencies in several nutrients essential necessary for the synthesis of proteins associated with DNA, such as folate, magnesium, vitamin B12 and zinc [29]. This observation is important because MNs are mainly generated by unrepaired or poorly repaired DSBs [48,49], which probably relates to the values obtained in the present study, as the average percentages of gH2AX-positive cells in the peripheral blood and splenic samples from both undernourished groups (UNM and UNS) showed a tendency to be increased compared with those in the WN group. These results indicate that the damage in the WN and UNM groups was effectively recognized and repaired, while that in the UNS group was recognized but not repaired, probably due to an alteration in the continuity of the signaling pathway in the UNS group.

These data open the possibility of doing more research on this topic to elucidate which point of the signaling pathway there is the alteration (s) that produce that this damage is not repaired in rats with severe malnutrition, generating an increase DNA damage, as indicated by results we previously presented [7,29]. Although the histone variant H2AX is phosphorylated, this event may not be sufficient to activate the subsequent signaling cascade. These results are potentially related to a deficiency in DDR continuity, or to alterations in the functionality of leukocytes as well as hypoplasia in lympho-hematopoietic organs in malnourished animals [50].

Although limited information is available on the exact mechanisms by which signaling pathways modulate the immune system under conditions of malnutrition, de Oliveira et al. [51] study provides an example. In this study, two-month old BALB/c mice were divided into two groups: those fed a low-protein diet and those fed a control diet. After 28 days of consuming the respective diets, the authors observed that the expression of phosphorylated NF- κ B (important for the proper functioning of macrophages) in malnourished mice was decreased compared with that in mice fed the control diet [51].

To carry out the phosphorylation posttranslational modification, protein kinases are used in ATP as a phosphate donor, and they bind a hydroxyl group to serine, threonine or tyrosine residues of the target protein [52]; similarly, the energy required for all cellular processes is obtained from ATP [53]. The results obtained by de Oliveira et al. as well as those in the present study are likely the product of inadequate protein consumption by the experimental groups, as protein intake is vital for supplying ATP to all bodily organs body and providing an adequate energy charge [54].

This study is the first to use the gH2AX assay to detect DSBs in genetic material as a result of moderate and severe experimental malnutrition in Wistar rats induced by the food competition method. The gH2AX assay provides evidence of processes related to the recognition of DNA damage caused by DSBs [55].

Therefore, additional studies on DSB-induced DNA damage must be performed.

5. Conclusions

Moderately and severely undernourished (UNM and UNS) rats have the capacity to detect damage in the genetic material, as determined by

increased cellular percentages of the phosphorylated proteins ATM and H2AX, these proteins represent only the beginning of the DNA DSB signaling pathway. To synthesize proteins and perform cellular processes, obtaining the necessary amino acids and energy is essential. We propose that restricting food from rats exposed to PCM, particularly UNS rats, by food competition compromises the continuity of DNA damage responses, including DNA repair.

Funding

This work was supported in part by the National Council of Science and Technology (CONACYT) México, through a scholarship for postgraduate studies (number 284113) awarded to Ana María González Gutiérrez.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Postgraduate in Experimental Biology program of the UAM Iztapalapa.

References

- [1] G. Padula, H.F. González, A. Varea, A.I. Seoane, Protein Energy-Malnutrition: Does the In Vitro Zinc Sulfate Supplementation Improve Chromosomal Damage Repair? *Biol. Trace Elem. Res.* 162 (1) (2014) 64–71, <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0109-2>.
- [2] O.A. Rotimi, S.O. Rotimi, F. Oluwafemi, O. Ademuyiwa, E.A. Balogun, Coexistence of aflatoxicosis with protein malnutrition worsens hepatic oxidative damage in rats, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 30 (6) (2016) 269–276, <https://doi.org/10.1002/jbt.21787>.
- [3] K.N. Ferraz-Pereira, R. da Silva Aragão, D. Verdier, A.E. Toscano, D.C. Lacerda, R. Manhães-de-Castro, A. Kolta, Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats, *Br. J. Nutr.* 114 (9) (2015) 1515–1530, <https://doi.org/10.1017/S0007114515003062>.
- [4] S.S. Moreno, T.M. Kalinne, L.D.A. Pereira, M.C. Alheiros-Lira, M.D. de Barbosa, A.P.V. Régo, et al., Moderate physical training attenuates perinatal low-protein-induced spleen lymphocyte apoptosis in endotoxemic adult offspring rats, *Eur. J. Nutr.* 55 (3) (2016) 1113–1122, <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0925-y>.
- [5] R.M. Betancourt, P. Balvanera, M.R. Ortiz, Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone-marrow cells of severely malnourished animals during early life, *Mutat. Res. Lett.* 175 (1) (1986) 29–31, [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(86\)90141-7](https://doi.org/10.1016/0165-7992(86)90141-7).
- [6] R.M. Betancourt, M.R. Ortiz, T.C. González, P. Pérez, L. Cortés, C.L. Rodríguez, L. Villaseñor, Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 331 (1) (1995) 65–77, [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00052-K](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00052-K).
- [7] B.E. Cortés, T.C. González, R.M. Betancourt, M.R. Ortiz, Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay, *Teratog., Carcinog. Mutagen.* 21 (3) (2001) 231–247, <https://doi.org/10.1002/tcm.1012>.
- [8] J.L. Tarry-Adkins, M.S. Martin-Gronert, D.S. Fernandez-Twinn, I. Hargreaves, M.Z. Alfaradhi, J.M. Land, et al., Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart, *J. Federation Am. Societies Experimental Biology* 27 (1) (2013) 379–390, <https://doi.org/10.1096/fj.12-218685>.
- [9] M.R. Ortiz, L. Cortés, T.C. González, L. López, P. Pérez, B.E. Cortés, R.M. Betancourt, Analysis of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (4) (1997) 363–370, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)30:4<363::AID-EMI>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:4<363::AID-EMI>3.0.CO;2-K).
- [10] E. Cervantes-Ríos, M.R. Ortiz, A.L. Martínez-Hernández, L. Rojo-Cabrera, J. Graniel-Guerrero, C.L. Rodríguez, Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 731 (1–2) (2012) 68–74, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.11.006>.
- [11] E. Cervantes-Ríos, C.L. Rodríguez, J. Graniel-Guerrero, M.A.R. Ortiz, Evaluación de la frecuencia y tipo de micronúcleos en niños con desnutrición moderada y grave, *Rev. Int. Contam. Ambient.* 30 (2014) 23–35 <https://www.revistascca.unam.mx/rca/index.php/rca/article/view/45969/41641>.
- [12] N.S. Gavande, P.S. VanderVere-Carozza, H.D. Hinshaw, S.I. Jalal, C.R. Sears, K.S. Pawelczak, J.J. Turchi, DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* 160 (2016) 65–83, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.003>.
- [13] D. Zhang, B. Tang, X. Xie, Y.-X. Feng, S.-M. Yang, J.-W. Zhang, The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy, *Cancer Biol. Ther.* 16 (7) (2015) 1005–1013, <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1046022>.
- [14] V. Valdiglesias, S. Giunta, M. Fenech, M. Neri, S. Bonassi, γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies, *Mutat. Res.* 753 (1) (2013) 24–40, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.02.001>.
- [15] J.S. Brown, S.P. Jackson, Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response, *Open Biol.* 5 (4) (2015), <https://doi.org/10.1098/rsob.1500018>.
- [16] G. Manic, F. Obrist, A. Sistigu, I. Vitale, Trial watch: targeting ATM–CHK2 and ATR–CHK1 pathways for anticancer therapy, *Mol. Cell. Oncol.* 2 (4) (2015), <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1012976>.
- [17] L. Solovjeva, D. Firsanov, A. Vasilishina, V. Chagin, N. Pleskach, A. Kropotov, M. Sveđlova, DNA double-strand break repair is impaired in presenescent Syrian hamster fibroblasts, *BMC Mol. Biol.* 16 (2015) 1–18, <https://doi.org/10.1186/s12867-015-0046-4>.
- [18] V. Jain, P.R.V. Kumar, P.K.M. Koya, G. Jaikrishan, B. Das, Lack of increased DNA double-strand breaks in peripheral blood mononuclear cells of individuals from high level natural radiation areas of Kerala coast in India, *Mutat. Res.* 788 (2016) 50–57, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.03.002>.
- [19] M. Sánchez-Flores, E. Pasaro, S. Bonassi, B. Laffon, V. Valdiglesias, γ H2AX assay as DNA damage biomarker for human population studies: defining experimental conditions, *Toxicol. Sci.* 144 (2) (2015) 406–413, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv011>.
- [20] B. Ye, N. Hou, L. Xiao, Y. Xu, H. Xu, F. Li, Dynamic monitoring of oxidative DNA double-strand break and repair in cardiomyocytes, *Cardiovascular Pathology* 25 (2) (2016) 93–100, <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2015.10.010>.
- [21] M.R. Ortiz, E. Cortés, C. González, L. Pérez, R.M. Betancourt, Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation, *Medical Sci. Res.* 24 (1996) 843–846 https://www.researchgate.net/publication/288469144_Assessment_of_an_experimental_method_to_induce_malnutrition_by_food_competition_during_lactation.
- [22] M.R. Ortiz, R.H. Medina, B.E. Cortés, R.E. Cervantes, C.L. Rodríguez, Trimethoprim-sulfamethoxazole increase micronuclei formation in peripheral blood from weanling well-nourished and malnourished rats, *Environ. Mol. Mutagen.* 52 (8) (2011) 673–680, <https://doi.org/10.1002/em.20670>.
- [23] A.S.A.A. Barbosa, S.M. Diório, S.C.B. Pedrini, A.J.F. Nunes, A.D.F.F. Belone, S.M.U.R. Silva, et al., The relevance of nutritional status and histopathological findings on the infectious process of BALB/C mice inoculated with *Lacazia loboi*, *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 57 (5) (2015) 421–426, <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500009>.
- [24] M.R. Ortiz, R.H. Medina, C.L. Rodríguez, H. González-Márquez, B.E. Cortés, Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats, *Environ. Mol. Mutagen.* 43 (2004) 179–185, <https://doi.org/10.1002/em.20009>.
- [25] X. Gao, F. Tian, X. Wang, J. Zhao, X. Wan, L. Zhang, et al., Leucine supplementation improves acquired growth hormone resistance in rats with protein-energy malnutrition, *PLoS One* 10 (4) (2015) 1–13, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125023>.
- [26] B.I.K. Nurliyani, S. Kusuma, Y.D. Trisnasari, Goat milk yoghurt by using Lacto-B culture modulates the production of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 in malnourished rats, *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 34 (1) (2014) 88–98, <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.1.88>.
- [27] E.F. Dos Santos-Junior, C. Gonçalves-Pimentel, L.C.C. De Araujo, T.G. Da Silva, M.R. De Melo-Junior, V. Moura-Neto, B.L.D.S. Andrade-da-Costa, Malnutrition increases NO production and induces changes in inflammatory and oxidative status in the distal colon of lactating rats, *Neurogastroenterol. Motil.* 28 (2016) 1204–1216, <https://doi.org/10.1111/nmo.12820>.
- [28] A.N. Vlasova, F.C. Paim, S. Kandasamy, M.A. Alhama, D.D. Fischer, S.N. Langel, et al., Protein malnutrition modifies innate immunity and gene expression by intestinal epithelial cells and human rotavirus infection in neonatal gnotobiotic pigs, *mSphere* 2 (2) (2017) 1–16, <https://doi.org/10.1128/mSphere.00046-17>.
- [29] M.R. Ortiz, B.E. Cortés, T.C. González, L. Pérez, R.M. Betancourt, Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1) (1995) 55–59, <https://doi.org/10.1002/em.2850260108>.
- [30] A.S. Mello, D.C. de Oliveira, B. Bizarro, A. Sá-Nunes, A.A. Hastreiter, J.B. Soares de Oliveira, et al., Protein malnutrition alters spleen cell proliferation and IL-2 and IL-10 production by affecting the STAT-1 and STAT-3 balance, *Inflammation* 37 (6) (2014) 2125–2138, <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9947-5>.
- [31] M. Fujinami, H. Kondo, K. Yufu, T. Shinohara, Y. Ishii, Y. Teshima, et al., Association between the baseline peripheral blood monocyte counts, the size of spleen, and the response to cardiac resynchronization therapy, *J. Cardiol.* 71 (3) (2018) 299–304, <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2017.09.004>.
- [32] V. Pant, A. Quintás-Cardama, G. Lozano, The p53 pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans, *Blood* 120 (2012) 5118–5127, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-356014>.
- [33] P. Borelli, F.E.V. Barros, K. Nakajima, S.L. Blatt, B. Beutler, J. Pereira, et al., Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (6) (2009) 523–530, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000600008>.
- [34] M.C. da Silva, V.P. Venancio, A.A. Ferro, L.C. Hernandez, M.M. de Bianchi, D.L.J.E. Cavalcanti, et al., Vitamin D3 deficiency increases DNA damage and the oxidative burst of neutrophils in a hypertensive rat model, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 798–799 (2016) 19–26, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox>.

- 2016.01.005.
- [35] G.D. Sckisel, A. Mirsoian, C.M. Minnar, M. Crittenden, B. Curti, J.Q. Chen, et al., Differential phenotypes of memory CD4 and CD8 T cells in the spleen and peripheral tissues following immunostimulatory therapy, *J. Immunother. Cancer* 5 (33) (2017) 1–11, <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0235-4>.
- [36] J. You, J. Liu, Y. Bao, W. Liqun, Y. Yu, W. Lei, et al., SEI1 induces genomic instability by inhibiting DNA damage response in ovarian cancer, *Cancer Lett.* 385 (2017) 271–279, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.032>.
- [37] D.J. Smart, K.P. Ahmedi, J.S. Harvey, A.M. Lynch, Genotoxicity screening via the γ H2AX by flow assay, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 715 (2011) 25–31, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.07.001>.
- [38] J. Wang, L. Yin, J. Zhang, Y. Zhang, X. Zhang, D. Ding, et al., The profiles of gamma-H2AX along with ATM/DNA-PKcs activation in the lymphocytes and granulocytes of rat and human blood exposed to gamma rays, *Radiat. Environ. Biophys.* 55 (2016) 359–370, <https://doi.org/10.1007/s00411-016-0653-6>.
- [39] B.D. Hare, T.M. Thornton, M. Rincon, B. Golijanin, S.B. King, D.M. Jaworski, W.A. Falls, Two weeks of variable stress increases gamma-H2AX levels in the mouse bed nucleus of the stria terminalis, *Neuroscience* 373 (2018) 137–144, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.024>.
- [40] D. Udayakumar, N. Horikoshi, L. Mishra, C. Hunt, T.K. Pandita, Detecting ATM-dependent chromatin modification in DNA damage response, *Methods Mol. Biol.* 1288 (2015) 317–336, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2474-5_18.
- [41] T. Tanaka, M. Kajstura, H.D. Halicka, F. Traganos, Z. Darzinkiewicz, Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes, *Cell Prolif.* 40 (1) (2007) 1–13, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00417.x>.
- [42] C.C. Márquez-Mota, C. Rodríguez-Gaytán, P. Adjibade, R. Mazroui, A. Gálvez, O. Granados, et al., The mTORC1-signaling pathway and hepatic polyribosome profile are enhanced after the recovery of a protein restricted diet by a combination of soy or black bean with corn protein, *Nutrients* 8 (9) (2016), <https://doi.org/10.3390/nu8090573>.
- [43] J. Pereyra-Venegas, B. Segura-Alegría, J. Guadarrama-Olmos, S. Mariscal-Tovar, S. Quiróz-González, I. Jiménez-Estrada, Effects provoked by chronic undernourishment on the fibre type composition and contractility of fast muscles in male and female developing rats, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 99 (5) (2015) 974–986, <https://doi.org/10.1111/jpn.12274>.
- [44] D. Carranza, A.K. Vega, S. Torres-Rusillo, E. Montero, L.J. Martínez, M. Santamaría, et al., Molecular and functional characterization of a cohort of spanish patients with Ataxia-Telangiectasia, *Neuromolecular Med.* 19 (1) (2017) 1–14, <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8440-8>.
- [45] I. Abe, K. Shirato, Y. Hashizume, R. Mitsuhashi, A. Kobayashi, C. Shiono, et al., Folate-deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats, *Environ. Health Prev. Med.* 18 (1) (2013) 78–84.
- [46] P. Lebailly, G. Mirey, F. Herin, Y. Lecluse, B. Salles, E. Boutet-Robinet, DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying season, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 88 (7) (2015) 963–972, <https://doi.org/10.1007/s00420-015-1024-3>.
- [47] N. Hyka-Nouspikel, K. Lemonidis, W.-T. Lu, T. Nouspikel, Circulating human B lymphocytes are deficient in nucleotide excision repair and accumulate mutations upon proliferation, *Blood* 117 (23) (2011) 6277–6286.
- [48] A. Bajjinski, A.T. Natarajan, K. Erixon, M. Harms-Ringdahl, DNA double strand breaks induced by the indirect effect of radiation are more efficiently repaired by non-homologous end joining compared to homologous recombination repair, *Mutat. Res.* 756 (1–2) (2013) 21–29, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.012>.
- [49] S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W.P. Chang, N. Holland, et al., An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, *Carcinogenesis* 28 (3) (2007) 625–631, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>.
- [50] R.A. Fock, M.A. Vinolo, S.L. Blatt, P. Borelli, Impairment of the hematological response and interleukin-1 β production in protein-energy malnourished mice after endotoxemia with lipopolysaccharide, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45 (12) (2012) 1163–1171, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500151>.
- [51] D.C. de Oliveira, A.A. Hastreiter, A.S. Mello, B.J.S. de Oliveira, S.E.W.C. Oliveira, P. Borelli, R.A. Fock, The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF- κ B expression via the TNF- α signaling pathway, *Cytokine* 69 (2) (2014) 218–225, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.06.004>.
- [52] T. Yang, J.R. Terman, Characterizing PKA-mediated phosphorylation of Plexin using purified proteins, *Methods Mol. Biol.* 1493 (2017) 147–159, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6448-2_10.
- [53] C. Ledderose, Y. Bao, M. Lidicky, J. Zipperle, L. Li, K. Strasser, et al., Mitochondria are gate-keepers of T cell function by producing the ATP that drives purinergic signaling, *J. Biol. Chem.* 289 (37) (2014) 25936–25945, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.575308>.
- [54] O.A.H. Ahmed-Farid, M. Nasr, R.F. Ahmed, R.M. Bakeer, Beneficial effects of curcumin nano-emulsion on spermatogenesis and reproductive performance in male rats under protein deficient diet model: enhancement of sperm motility, conservancy of testicular tissue integrity, cell energy and seminal plasma amino acids content, *J. Biomed. Sci.* 24 (66) (2017) 1–14, <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0373-5>.
- [55] T. Kurashige, M. Shimamura, Y. Nagayama, Differences in quantification of DNA double-strand breaks assessed by 53BP1/ γ H2AX focus formation assays and the comet assay in mammalian cells treated with irradiation and N-acetyl-L-cysteine, *J. Radiat. Res.* 57 (3) (2016) 312–317, <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw001>.