

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



“Detección de rupturas de doble cadena en el ADN por medio de la histona H2AX
fosforilada en linfocitos de ratas desnutridas”

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

B.E. Ana María González Gutiérrez

Comité Tutorial:

Directora

Dra. Edith Cortés Barberena

Asesores

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

M.B.E. Roberto Lazzarini Lechuga

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

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

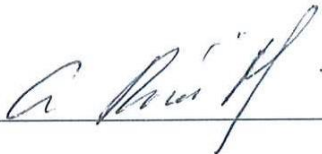
El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Detección de rupturas de doble cadena en el ADN por medio de la histona H2AX fosforilada en linfocitos de ratas desnutridas", que presentó

Ana María González Gutiérrez

El día 23 de febrero del año 2015

Presidente

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz



Secretario

Dra. Sara Frías Vázquez



Vocal

Dra. Elsa Cervantes Ríos



Vocal

Dr. José Luis Gómez Olivares



COMITÉ TUTORAL

Dra. Edith Cortés Barberena

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

cobe@xanum.uam.mx

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

arom@xanum.uam.mx

M.B.E. Roberto Lazzarini Lechuga

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

lazzarini@xanum.uam.mx

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primeramente A MI PADRE por existir (¿Qué haría sin ti?), pues aún con mis intensidades, sólo haz hecho una cosa que me hace completamente feliz: amarme. TE AMO. GRACIAS POR TODO.

A mi Madre, por tu esfuerzo constante y tus consejos. TE AMO.

A mi Hermano, por los flashazos de sabiduría y tu forma tan diferente de ver la vida. Por tu sentido del humor cuando amaneces del lado correcto. Eres importante para mí.

A mi abuelita “Blandita” por el ejemplo tan grande de vida, por mostrarme lo que realmente es el desprendimiento. Aunque nuestro carácter choca algunas veces, TE AMO.

A Molly, si bien en algunos momentos me alteras, he comprendido que lo único que necesitas es amor.

A Kevin, por tus gracias en momentos de obscuridad, siempre lograste sacarme una sonrisa. Te extraño.

A Raquel (“palomita de la paz”). El comienzo no fue bueno, sin embargo, el tiempo nos ha enseñado que el cariño logra colarse donde uno menos lo espera.

A Clementina (“tiburoncita”), me has hecho ver que realmente perteneces a la familia.

A Terry, (“mi redención”) tus canciones promueven recuerdos positivos en mí.

A mis amigos:

José C. Silva Muñiz, por distraerme en tiempos complicados; Karla N. Ángeles Vera, Claudia E. Sánchez Catalán, Viemy M. Genico Carreño y C. Norma Benítez Rafael, por su amistad y los momentos compartidos.

Daniel M. Lugo, por ser prácticamente un hermano, por escucharme y alentarme.

Bibiana Gtz., por tu amistad, tus consejos, las risas e incluso las diferencias.

A mi tía María P. Hidalgo, por infundirme ánimo.

A Shei, Alex, Steph y Yad, por los momentos compartidos de dificultad y felicidad durante este proceso.

A todas las personas que sin saberlo, contribuyeron de alguna manera a que esto hoy sea realidad.

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

El tiempo pasa veloz y sin embargo no es poco lo que nos toca vivir, aunque lo vivamos sin darnos demasiada cuenta.

Para bien o para mal, lo que hemos vivido solos no es nada, y lo que hemos compartido lo es casi todo. A la memoria no le gustamos solos.

Créame: el sentimiento es mucho más letal de lo que solemos pensar.

La gente piensa que somos ridículos, pero nosotros nos sentimos ricos porque tenemos ese tesoro, ese poco de oro que cabe cien veces en el hueco de la mano y, sin embargo, es tan cálido que todo lo demás resulta frío y opaco; ese ser virtual que normalmente permanece enterrado, ese ser despierto que tiene que soportar la pesadilla que es el mundo. Y aflora en la voz, en ella vive y perdura; a veces alguien lo escucha.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz, por alimentar mi cuerpo y alma en momentos particularmente laboriosos.

A la Dra. Edith Cortés Barberena, por la sombrilla en tiempo de lluvia y el ajetreo de los últimos días.

A la Dra. Leonor Rodríguez Cruz, por aceptar correspondencia y las charlas amenas.

A la Dra. Elsa Cervantes Ríos, por la revisión de esta tesis, los consejos y los momentos compartidos.

Al M.B.E. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga, por su valioso apoyo técnico, las clases exprés y los consejos. =)

Al Dr. Rodolfo Velazco Lezama y a la Maestra Rafaela Tapia Aguilar, por mantener las puertas abiertas del laboratorio S-254 cuando las he necesitado.

A la Dra. Sara Frías Vázquez, por aceptar participar en el presente, dadas las circunstancias.

Al Dr. José Luis Gómez Olivares, por la revisión de esta tesis.

Porque la esperanza de llegar a ser uno mismo es uno de esos males incurables.

Todo conocimiento, todo reconocimiento, nace de una herida del corazón.

Incluso los hombres trabajan unos para otros mientras creen que trabajan sólo para sí mismos, cada uno ocupado en amasar su propia fortuna...¡Ah, si el mundo supiera que todo y cada cosa colabora, en cada instante, para fabricar el futuro, quizás los hombres no serían tan infelices!

En el fondo nada es grande ni pequeño de por sí, ¿verdad?

Sans la miséricorde du Christ. Héctor Bianciotti.

1ª edición, 1987.

RESUMEN

La desnutrición calórico proteica (DCP) es un estado patológico caracterizado por la falta de aporte adecuado de nutrimentos acordes con las necesidades biológicas del organismo. Existen referencias alrededor de la relación desnutrición y daño al ADN. Son diversos los elementos capaces de inducir daño al material genético: estilo de vida, medicamentos, polimorfismos genéticos y medio ambiente se encuentran entre los principales.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la desnutrición calórico proteica sobre el daño al ADN en linfocitos de ratas lactantes. La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante la lactancia, aumentando el número de crías por madre. Se provocó daño al ADN, tratando las células con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 100 μ M durante 1 h. Por lote, se obtuvieron muestras en presencia y ausencia del agente, teniendo finalmente 6 grupos. Para el reconocimiento de linfocitos T se utilizó anti-CD3 FITC. Para revelar la presencia de rupturas de doble cadena en el ADN de linfocitos, mediante la detección de la histona γ -H2AX se ocupó anti-H2AX fosforilada FITC; se identificó por citometría de flujo y microscopía confocal. Para confirmar que existe daño en el material genético, empleamos la cuantificación de p53, utilizando anticuerpo anti-p53 (pS37) y un segundo anticuerpo conjugado con PerCP/Cy5.5; esta proteína fue identificada por citometría de flujo. Para complementar los resultados obtenidos, se empleó la metodología de electroforesis unicelular en condiciones alcalinas (ensayo cometa). Con esta técnica, al someter el material genético a un campo eléctrico, se pueden detectar

rompimientos de cadena doble o de cadena sencilla. La imagen que se obtiene es semejante a la de un cometa en el que la cabeza es el nucleoide y el ADN fragmentado es la estela, cuya longitud refleja la cantidad de daño.

El porcentaje de linfocitos que expresaron γ -H2AX fue significativamente mayor en los grupos de ratas desnutridas de 2^o y 3^{er} grado en presencia y ausencia de H₂O₂. El aumento en el grupo DN2^o fue de 4 veces y de 2.9 veces para DN2^oH₂O₂; para el grupo DN3^{er} fue de 7.94 veces y el grupo de 3^{er} grado en presencia de peróxido tuvo un incremento de 16.1 veces en comparación con el lote testigo. En el caso de p53 (que responde a daños celulares), los datos muestran un incremento significativo de 1.25 veces en el grupo DN2^o y de 1.5 en BNH₂O₂ y un decremento significativo en los grupos de ratas desnutridas de 3^{er} grado en presencia (2.9 veces) y ausencia de H₂O₂ (1.5 veces) con respecto a los animales BN.

El análisis por microscopía confocal indicó un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia solo en el grupo DN3^{er}H₂O₂ comparado con el grupo BN de 27.3 veces.

El ensayo cometa mostró un aumento considerable del número de nucleoides con migración clasificada como alta en los grupos de ratas con desnutrición de 2^o y 3^{er} grado en presencia y ausencia de H₂O₂, siendo mayor en los grupos con desnutrición grave.

Las lesiones observadas en el material genético, pueden deberse a la insuficiencia de varios nutrientes necesarios para la síntesis de proteínas relacionadas con la

integridad del ADN o esenciales para los mecanismos de reparación del mismo y/o a la falta de disponibilidad de las moléculas necesarias para proteger a las células.

Los resultados obtenidos sugieren que la desnutrición provoca rupturas de doble cadena en el ADN e induce una disminución considerable en la capacidad celular para repararlas, estas pueden ser detectadas con alta sensibilidad evaluando la expresión de la histona γ -H2AX.

ABSTRACT

The protein calorie malnutrition (DCP) is a condition characterized by a lack of adequate supply of nutrients consistent with the biological needs of the organism. There are references about malnutrition and related DNA damage. Various elements are capable of inducing damage to genetic material: lifestyle, medications, genetic polymorphisms and environment are among the principal.

The aim of this study was to determine the effect of protein calorie malnutrition on DNA damage in lymphocytes of lactating rats. Malnutrition was induced by the method of competition for food during lactation, increasing the number of offspring per mother. Damage was caused to the DNA, treating the cells with hydrogen peroxide (H_2O_2) 100 μ M for 1 h. Batch, samples in the presence and absence of the agent is obtained, finally having 6 groups. For T cell recognition of anti-CD3 PE was used. To reveal the presence of double-stranded breaks in the DNA of cells, by detecting γ -H2AX histone dealt anti-H2AX FITC phosphorylated; were identified by flow cytometry and confocal microscopy. To confirm that there is damage to the genetic material, we used p53 quantification using anti-p53 antibody (pS37) and a second antibody conjugated to PerCP / Cy5.5; this protein was identified by flow cytometry. To complement these results, the methodology unicellular electrophoresis under alkaline conditions (comet assay) was used. With this technique, the genetic material subjected to an electric field, can detect breaks in double-stranded or single-stranded.

The image obtained is similar to that of a comet in which the head is the nucleoid and fragmented DNA is the stele, which reflects the amount of damage.

The percentage of lymphocytes expressing γ -H2AX was significantly higher in the groups of rats undernourished 2nd and 3rd grade in the presence and absence of H₂O₂. The increase in DN2^o group was 4 times and 2.9 times for DN2ndH₂O₂; DN3rd for the group was 7.94 times and the group of 3rd grade in the presence of peroxide was increased 16.1 fold compared to the control batch. In the case of p53 (responding to cell damage), the data show a significant increase of 1.25 times in the DN2^o group and 1.5 in BNH₂O₂ and a significant decrease in the groups of rats undernourished 3rd grade in the presence (2.9 times) and absence of H₂O₂ (1.5 fold) relative to BN animals.

Confocal microscopy analysis indicated a significant increase in fluorescence intensity only in the group DN3rdH₂O₂ compared with BN group to 27.3 times.

The comet assay showed a significant increase in the number of nucleoids with migration classified as high in the groups of rats undernourished 2nd and 3rd grade in the presence and absence of H₂O₂, being higher in the group with severe malnutrition.

The lesions observed in the genetic material, may be due to the failure of various nutrients necessary for the synthesis of proteins related to DNA integrity or essential to the repair mechanisms thereof and/or the unavailability of the necessary molecules to protect cells.

The results suggest that malnutrition causes double strand breaks in DNA and induces a significant decrease in cell capacity for repair, these can be detected with high sensitivity by evaluating the expression of histone γ -H2AX.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BN	Ratas bien nutridas
BNH₂O₂	Ratas bien nutridas con peróxido de hidrógeno
Cy 5.5	Cianina 5.5
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCP	Desnutrición calórico proteica
DN	Ratas desnutridas
DN^{2º}	Ratas con desnutrición moderada (2º grado)
DN^{2º}H₂O₂	Ratas con desnutrición moderada y peróxido de hidrógeno
DN^{3er}	Ratas con desnutrición grave (3er grado)
DN^{3er}H₂O₂	Ratas con desnutrición grave y peróxido de hidrógeno
DSB	Rupturas de Doble Cadena
FITC	Fluoresceína
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
MPT	Mutaciones post traduccionales
NBF	Formalina neutra
PAF	Paraformaldehído
PBS	Buffer de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridina clorofila

SSB

Rupturas de Cadena Sencilla

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
Desnutrición	1
Modelos experimentales para su estudio	4
Genotoxicidad	5
Especies Reactivas de Oxígeno	6
Fuentes de las Especies Reactivas de Oxígeno.....	8
Especies Reactivas de Oxígeno vs proteínas	8
Especies Reactivas de Oxígeno vs Ácido Desoxirribonucleico.....	9
ANTECEDENTES	10
Hematopoyesis y sangre.....	10
Importancia del Ácido Desoxirribonucleico	11
Estudios de daño citogenético en la desnutrición.....	12
El Nucleosoma	14
La histona H2AX.....	16
p53	22
JUSTIFICACIÓN	24
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Desnutrición experimental por competencia de alimento	27
Grado de desnutrición.....	27
Extracción de sangre.....	28
Marcaje de linfocitos T	28
Viabilidad celular	28

Inducción de daño al ADN en linfocitos	29
Marcaje de H2AX fosforilada y p53	29
ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	30
Selección de la región de análisis	30
MICROSCOPIA CONFOCAL.....	32
Separación de linfocitos en sangre	32
Marcaje de la muestra	33
Montaje de la muestra	33
ENSAYO COMETA	34
Preparación de las muestras	35
Tinción y observación de las muestras.....	36
ANÁLISIS DE RESULTADOS	36
RESULTADOS.....	36
Evaluación de la desnutrición experimental.....	36
Viabilidad	39
Citometría de Flujo	39
Microscopía Confocal.....	45
Ensayo Cometa	47
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES	60
CONSIDERACIONES	61
PERSPECTIVAS.....	63
REFERENCIAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de ERO.....	6
Figura 2. Los diversos linajes celulares generados durante la hematopoyesis	11
Figura 3. Nucleosoma eucariota	15
Figura 4. Diferencias entre H2A (histona canónica) y H2AX (variante).	17
Figura 5. Reclutamiento de factores de reparación.....	18
Figura 6. Fosforilación de la histona H2AX.....	19
Figura 7. Vías de fosforilación de H2AX	21
Figura 8. Modificaciones post-traduccionales de p53.....	22
Figura 9. Estrategia de análisis.....	31
Figura 10. Separación de linfocitos utilizando Lymphoprep®.	32
Figura 11. Principios generales de la prueba cometa	34
Figura 12. Efectores clave en la respuesta al daño al ADN.	61
Figura 13. Vía de señalización de H2AX.	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. ERO más importantes. (Halliwell 2006).	7
Cuadro 2. Peso de las ratas utilizadas (en gramos) el día 21.	37
Cuadro 3. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+.	40
Cuadro 4. Porcentaje de linfocitos p53+.	42
Cuadro 5. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+ y p53+.	44
Cuadro 6. Intensidad de fluorescencia de γ -H2AX en linfocitos.....	46
Cuadro 7. Proporción de cometas presentes en linfocitos.	48

Cuadro 8. Promedio de migración en cometas de linfocitos 50

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Aumento de peso en ratas 39

Gráfica 2. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+..... 41

Gráfica 3. Porcentaje de linfocitos p53+ 43

Gráfica 4. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+ y p53+..... 45

Gráfica 5. Intensidad de fluorescencia de γ -H2AX en linfocitos 47

Gráfica 6. Proporción de nucleoides obtenido por electroforesis unicelular..... 49

Gráfica 7. Promedio de migración en cometas obtenido por electroforesis unicelular de linfocitos..... 52

INTRODUCCIÓN

Desnutrición

La desnutrición calórico proteica (DCP) es un estado patológico caracterizado por la falta de aporte adecuado de energía y/o de nutrientes acordes con las necesidades biológicas del organismo. La asimilación deficiente de nutrientes es consecuencia de la falta de ingestión de los mismos, aumento de los requerimientos, su gasto excesivo, o como resultado de la combinación de los tres factores. Este estado ocasiona pérdida de las reservas del organismo, favoreciendo la susceptibilidad a las infecciones y alojando la serie: desnutrición-infección-desnutrición. (Castro y cols. 2005). Esta situación puede presentarse por el acceso restringido al alimento y/o como producto de alguna enfermedad, ya que se ha documentado que la función y producción de linfocitos T disminuyen en función de la falta de nutrientes (Chinen y cols. 2008).

La nutrición es un requisito que atañe a los seres vivos. Problemas de deficiencia o exceso de nutrientes han acompañado al hombre en el curso de la evolución (Montilva y cols. 2003). La desnutrición por deficiencia de micronutrientes es un problema de salud pública, vigente en regiones industrializadas y con en países en desarrollo (Guerra 2005).

Desde el punto de vista clínico, las consecuencias de la DCP se han asociado con alteraciones metabólicas, así como con el aumento de la susceptibilidad a infecciones (inmunodepresión), ya que altera al sistema inmunológico innato y

adaptativo, modificando el ritmo idóneo de la hematopoyesis (Borelli y cols. 2009). La deficiencia de nutrientes altera diversos procesos fisiológicos, incluyendo la hematopoyesis y la respuesta inmunológica, provocando alteraciones estructurales en los órganos linfoides dando como resultado una disminución en la generación de células hematopoyéticas, que podría interferir con la resistencia a las infecciones (Xavier y cols. 2007)

A nivel mundial, una tercera parte de la población infantil aproximadamente, padece DCP en algún grado, y es la causa del 55% de los decesos de infantes entre 1 y 4 años de edad. Los sitios geográficos más afectados son Asia, África, Oceanía y América Latina (Nájera y cols. 2001a; Pelletier y cols. 2003).

En México, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) realizó en 2012 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). Los resultados obtenidos señalaron que en nuestro país existen 302 279 niños menores de cinco años que presentan peso bajo, representando el 2.8%; 1 467 757 niños (13.6%) con talla baja y 171 982 (1.6%) mostraron desnutrición grave. Este reporte resalta que la prevalencia de la desnutrición en sus diferentes formas entre niños menores de cinco años se ve disminuida entre 2006 y 2012.

Así mismo, la ENSANUT muestra que la prevalencia de baja talla en infantes menores de cinco años aumentó de 1.2 a 1.5 millones aproximadamente. Además, se encontró que la prevalencia nacional de anemia observada fue de 2 084 738 (23.3%).(INSP 2012).

En nuestro país los índices más altos de desnutrición en nuestro país se encuentran en Yucatán, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Chiapas y Campeche,

presentando una prevalencia de 46.4%, con la siguiente distribución: 36.1% leve (1er grado), 9% moderada (2º grado) y 1.3% grave (3er grado) (Parra-Gómez y cols. 2003).

Son diversos los mecanismos a través de los cuales la desnutrición multiplica la susceptibilidad a las infecciones. La función inmunológica se encuentra afectada ampliamente en individuos con insuficiencia calórico proteica. Un ejemplo a lo anterior, se relaciona con observaciones acerca de un cambio (aumento o disminución) en las subpoblaciones de linfocitos (Najera y cols. 2004).

Aunque existen diversos reportes que sustentan el efecto nocivo de la desnutrición con respecto al sistema inmunológico, falta información para describir el o los mecanismo(s) molecular(es) por el(los) cual(es) se lleva(n) a cabo. (Macallan 2005).

En algunos reportes, un aumento en la proporción de linfocitos se ha hecho evidente; entretanto, otros muestran una disminución de las proporciones de linfocitos (Najera y cols. 2004).

La primera clasificación de la desnutrición en nuestro país, fue propuesta por el pediatra mexicano, Federico Gómez, y se conoce como Clasificación de Gómez. Este médico utilizó como indicador la relación peso para la edad y consta de tres grados, que dependen de la severidad de la falta de peso tomando como peso ideal la mediana de una población de referencia (Gueri y cols. 1980):

- ❖ Primer grado o desnutrición leve: deficiencia del 10 al 25% del peso que debe tener un niño en relación a su edad.

- ❖ Segundo grado o desnutrición moderada: deficiencia del 26 al 40%.
- ❖ Tercer grado o desnutrición grave: deficiencia mayor al 40%.

Esta clasificación además de seguir vigente, es muy útil para propósitos clínicos y de investigación. Es importante considerar el déficit de peso y talla con respecto a lo esperado para la edad, así como observar diversas características clínicas (Ortiz y cols. 2006).

Modelos experimentales para su estudio

En el estudio de los efectos de la desnutrición, se han empleado animales que van desde perros, monos y cerdos (Lykke y cols. 2013). Sin embargo, primordialmente se utiliza la rata y el ratón, en diferentes etapas de la vida (prenatal, postnatal y adulta). Estos animales presentan ventajas dentro de las que se encuentran la posibilidad de realizar estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, estudiar posibles efectos en diferentes grados de desnutrición, obtención de células provenientes de diferentes órganos, su bajo costo y su ciclo de vida relativamente corto (Birke 2003).

La desnutrición experimental durante la lactancia es un buen modelo de estudio, debido a que esta etapa es crítica en el crecimiento y desarrollo del organismo. En ella, las alteraciones por falta de nutrimentos son más graves en relación a las observadas en adultos, incluso se ha observado que los daños causados por este padecimiento son irreversibles (Ortiz y cols. 2000).

Fundamentalmente se utilizan dos métodos para inducir desnutrición durante la lactancia en animales experimentales: Uno basado en la baja calidad de la leche,

donde la camada es alimentada por una madre desnutrida (Araújo y cols. 2010); el otro método consiste en reducir la cantidad de alimento disponible al incrementar el número de crías por nodriza, con ello, la cantidad de leche consumida por cría es menor (Ortiz y cols. 1999).

El laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, ha utilizado el método de competencia de alimento durante la lactancia para estudiar los efectos de la desnutrición, evidenciando que se trata de un método eficaz y reproducible para inducirla, presentando ventajas: Provee altas cantidades de ratas desnutridas de segundo y tercer grado, con bajo efecto en el índice de mortandad (Ortiz y cols. 1999).

Genotoxicidad

Los organismos estamos expuestos constantemente a elementos capaces de provocar alteraciones orgánicas y/o funcionales. Existen diversos factores capaces de inducir daño al material genético: estilo de vida, medicamentos, polimorfismos genéticos y medio ambiente se encuentran entre los principales. (Zúñiga G. 2006).

Las rupturas de doble cadena (DSBs) en el ADN, constituyen una de las mayores amenazas para la viabilidad celular, llegando incluso a considerarse letales. Las DSBs están asociadas con alteraciones y/o cambios en la arquitectura de la cromatina, incluyendo aumento en la movilidad de nucleosomas en dominios adyacentes al lugar del daño (Xu Ye 2011).

El reconocimiento eficiente de los sitios dañados en el ADN, es importante para su reparación, en particular las DSBs y es fundamental para mantener la

estabilidad genómica y la homeostasis celular. Una reparación incorrecta de ADN puede conducir a oncogénesis (Redon y cols. 2012).

Especies Reactivas de Oxígeno

Se denomina agente oxidante a todo compuesto que puede aceptar electrones, incluyendo al oxígeno (figura 1). A determinados compuestos de este grupo, se les nombra especies reactivas de oxígeno (ERO) ya que presentan la característica de ser muy reactivos.

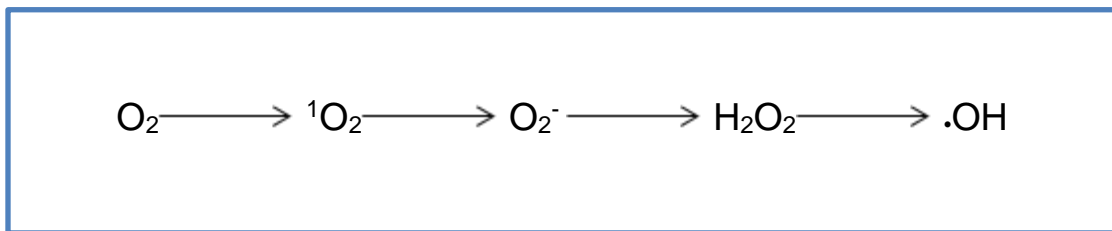


Figura 1. Generación de ERO. El oxígeno se reduce debido a la transferencia de un e^- . La vía de oxidación del oxígeno comienza con la generación de oxígeno singulete, enseguida se forma anión superóxido, después el peróxido de hidrógeno y finalmente el radical hidroxilo (Ibuki y cols. 2014).

Las ERO se clasifican en no radicales y radicales libres (cuadro 1). Los compuestos no radicales son moléculas reactivas que producen radicales libres. Por otro lado, los radicales libres son átomos o moléculas que poseen un electrón (e^-) desapareado en el último orbital; lo anterior, les proporciona una fuerte tendencia a recibir u otorgar e^- , aunado a su inestabilidad. Dichos radicales se pueden formar por diversos mecanismos, como la adición a un compuesto no radical de un electrón único (Halliwell y cols. 2004; Halliwell 2006; Petersen 2013.).

Especies Reactivas de Oxígeno más comunes	
Radicales	No radicales
Superóxido $\rightarrow O_2^-$	Peróxido de hidrógeno $\rightarrow H_2O_2$
Hidroxilo $\rightarrow \bullet OH$	Ácido hipocloroso $\rightarrow HOCl$
Peroxilo $\rightarrow \bullet RO_2$	Ácido hipobromoso $\rightarrow HOBr$
Hidroperoxilo $\rightarrow \bullet HO_2$	Ozono $\rightarrow O_3$
Carbonato $\rightarrow \bullet CO_3^-$	Oxígeno singulete $\rightarrow {}^1O_2$
Alcoxilo $\rightarrow \bullet RO$	Peróxidos orgánicos $\rightarrow ROOH$
Dióxido de carbono $\rightarrow \bullet CO_2^-$	

Cuadro 1. ERO más importantes. (Halliwell 2006).

Son diversas las moléculas que pueden verse afectadas por ERO, dentro de las principales se encuentran: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que de ser modificadas, daría como resultado alteraciones en la respuesta celular. Los ácidos nucleicos, por ejemplo, contienen la información referente a las funciones celulares; por su parte, las proteínas, son moléculas que llevan a cabo numerosas actividades.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dentro de la clasificación mencionada, está considerado en el grupo de los no radicales. Presenta difusión tisular considerable ya que es una molécula sin carga y pequeña, además, es soluble en lípidos, lo cual le permite atravesar membranas celulares y afectar más profundamente (Lobo y cols. 2010). En condiciones fisiológicas, el H_2O_2 representa aproximadamente el 2% de la absorción total de oxígeno por el organismo (Inoue y cols. 2003).

Fuentes de las Especies Reactivas de Oxígeno

Se pueden originar de fuentes exógenas y endógenas. Los procesos exógenos son diversos; los sobresalientes incluyen carcinógenos no genotóxicos, generando ERO de manera directa o indirecta, radiación y barbitúricos. Dentro de las vías endógenas potenciales se encuentran: las mitocondrias, los peroxisomas, el metabolismo del citocromo P450 y la activación de células inflamatorias. Otra fuente endógena muy importante son los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Los macrófagos activados, para dar lugar a diversas ERO (O_2^- , H_2O_2 , etc.) comienzan elevando la absorción de oxígeno. Por su parte, la ruptura o desacoplamiento del citocromo P450, también genera especies reactivas, principalmente H_2O_2 y anión superóxido (Valko y cols. 2006).

Especies Reactivas de Oxígeno vs proteínas

Al parecer, las proteínas que presentan mayor vulnerabilidad a la oxidación son aquellas que poseen aminoácidos como histidina, arginina, cisteína y metionina (Valko y cols. 2007).

Existen tres formas mediante las cuales las ERO modifican a las proteínas por oxidación:

- Modificación oxidativa de un aminoácido específico.
- Formación de productos proteínicos dañados que pueden reaccionar con productos de lipoperoxidación.
- Ruptura del péptido por medio de radicales libres (elevándose la probabilidad de sufrir proteólisis enzimática).

Lo anterior, altera el funcionamiento del organismo, ya que se afecta la correcta actividad de receptores, enzimas, transportadores de membrana, estabilidad térmica, transducción de señales, etc. (Lobo y cols. 2010).

Especies Reactivas de Oxígeno vs Ácido Desoxirribonucleico

A concentraciones altas, las ERO consiguen mediar daños a nivel de la información genética. Un ejemplo de ello es el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el cual es altamente reactivo; al entrar en contacto con el ADN, reacciona con los dobles enlaces de las bases nitrogenadas y sustituye a un átomo de hidrógeno en los grupos metilos. Las cinco bases nucleotídicas presentan una atracción y reactividad considerable con el $\bullet\text{OH}$. El daño en el ADN inducido por ERO da como resultado rupturas de cadena doble y sencilla, modificaciones en purinas, pirimidinas, desoxirribosa así como enlaces cruzados en el material genético, acarreado paro o inducción de la transcripción, y promueve la transducción de señales, inestabilidad genómica y errores en la duplicación (Valko y cols. 2006).

El daño oxidante puede considerarse el primer paso para la mutagénesis, envejecimiento y carcinogénesis. La agresión oxidante dependerá de la distribución y abundancia de cada componente en el ADN (Cooke y cols. 2003).

ANTECEDENTES

Hematopoyesis y sangre

Las células sanguíneas cuentan con una vida media corta, por lo que son remplazadas de manera continua. El proceso por el cual las células de la sangre se forman se denomina hematopoyesis. Durante su desarrollo, sólo un número limitado de células madre hematopoyéticas multipotenciales se diferencian en células de todos los linajes que constituyen la sangre. Los linajes celulares se determinan funcional y morfológicamente mediante una compleja red de factores de transcripción que definen los patrones de expresión de genes específicos para cada tipo celular. La hematopoyesis es extremadamente dinámica, y responde a estímulos externos, tales como infecciones o lesiones, para favorecer la diferenciación o la proliferación como sea necesario (Lazare y cols. 2014).

A partir de la activación de la célula madre hematopoyética, surgen las dos subdivisiones celulares principales de este tejido el linfoide y el mieloide. Este último genera plaquetas, eritrocitos y células como macrófagos y granulocitos; por su parte el linfoide, da origen a diversas poblaciones de linfocitos (figura 2).

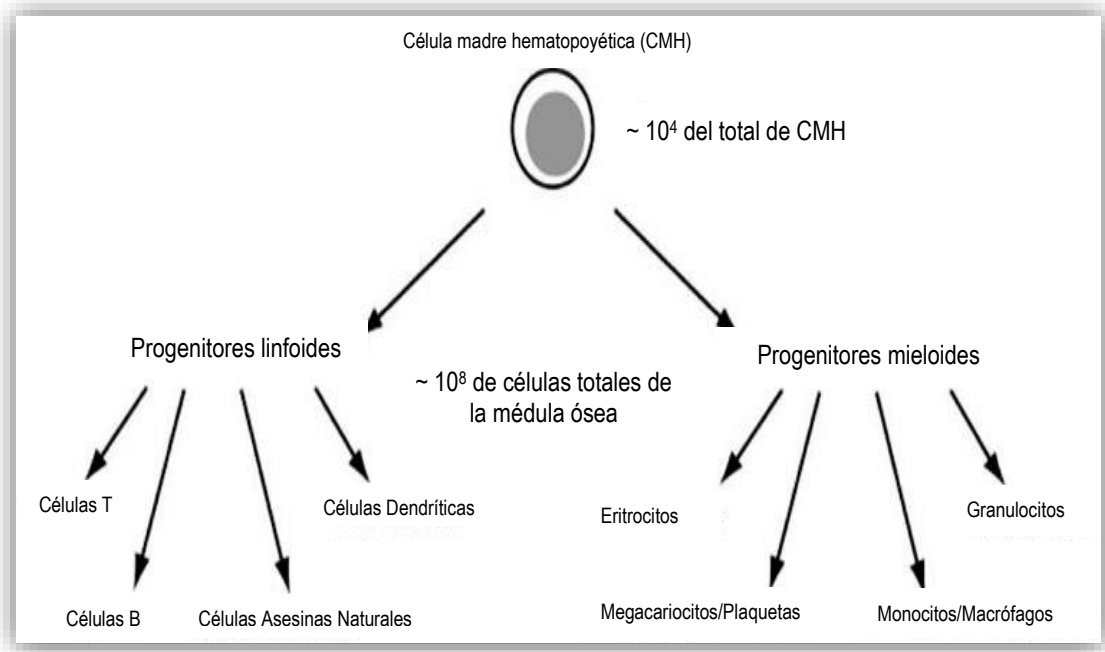


Figura 2. Los diversos linajes celulares generados durante la hematopoyesis. Después de su activación, la célula madre hematopoyética (CMH) puede diferenciarse en células progenitoras con la capacidad de expandirse y continuar la diferenciación. (Nemeth y cols. 2007).

Importancia del Ácido Desoxirribonucleico

La integridad del ADN es un aspecto fundamental para la salud y el buen funcionamiento del organismo. Sin embargo, el material genético es susceptible de ser dañado por numerosos agentes y/o procesos.

Con el fin de proteger la integridad del ADN, las células han desarrollado diferentes vías de respuesta que inician la reparación, coordinándose con la transcripción y la duplicación del ADN, así como la progresión del ciclo celular. Las principales estrategias de reparación son reversión directa de la lesión, escisión del ADN dañado, y volver a unir las hebra(s) rota(s) de ADN (Ward y cols. 2004).

Aunque la mayoría del daño que se produce en el material genético es restaurado eficientemente por una compleja maquinaria enzimática de reparación, parte de él escapa a este proceso. Estas lesiones no reparadas, o mal reparadas, pueden afectar diversos mecanismos tales como el control del ciclo celular y la expresión génica, entre otros (Halliwell 2000).

Estudios de daño citogenético en la desnutrición

En México, existen varios grupos de investigación que han abordado este padecimiento a diferentes niveles: fisiológico, bioquímico, celular y citogenético. La desnutrición tiene efectos adversos sobre diferentes tipos celulares; sin embargo, aún falta profundizar sobre las repercusiones que tiene en el desarrollo y la salud posterior del organismo, así como indagar cuáles son los factores principales relacionados con las alteraciones observadas (Ortiz y cols. 2006).

Betancourt y cols., en 1986 observaron que la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas es alta en ratas con DCP (Betancourt y cols. 1986). En 1995, utilizando el ensayo cometa, se detectó que la desnutrición causa daño al ADN; lo anterior, se ha relacionado con infecciones existentes y al tratamiento farmacológico de los niños con dichas infecciones (Betancourt y cols. 1995). Más adelante, en 1997, Ortiz y cols., observaron que la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos de niños con DCP era más alta en comparación con niños sanos bien nutridos (Ortiz y cols. 1997).

En el año 2001, Cortés y cols., evidenciaron que la DCP está asociada a daño al ADN en bazo, médula ósea y sangre periférica (Cortés y cols. 2001). En 2010,

Fenech reafirma que al existir una dieta deficiente de folato y los metabolitos asociados, como la homocisteína, se puede acelerar el daño al ADN (Fenech 2010).

Para 2012, Cervantes-Ríos y cols., observaron que la frecuencia de MN en reticulocitos de niños con DCP es mayor, sugiriendo que las infecciones bacterianas y la desnutrición inducen daño al ADN (Cervantes-Ríos y cols. 2012).

Por su parte Tarry-Adkins y cols., en el año 2013, llegaron a la conclusión de que la nutrición deficiente seguida de crecimiento postnatal acelerado, incrementa el estrés oxidante, nitrosativo (efectuado por las especies reactivas de nitrógeno) y conduce a daño al ADN en ratas (Tarry-Adkins y cols. 2013).

Las lesiones observadas en el ADN, pueden deberse a la insuficiencia de nutrimentos necesarios para la síntesis de proteínas relacionadas con la integridad del ADN o esenciales para los mecanismos de reparación del mismo y/o a la falta de disponibilidad de las moléculas necesarias para proteger a las células (Cortés y cols. 2001).

Existen diversos procedimientos para observar los efectos de distintos agentes (físicos y químicos) sobre la información genética y los riesgos que lo anterior representa para la integridad del organismo (Abramsson-Zetterberg y cols. 2000), (Krishna y cols. 2000), entre ellos se encuentran: el ensayo de MN, detección de aberraciones cromosómicas, ubicación de mutaciones puntuales y medición de proteínas asociadas al ADN, por mencionar algunos (Abramsson-Zetterberg y cols. 2000).

Las aberraciones cromosómicas estructurales, los micronúcleos y las aberraciones puntuales pueden ser resultado de eventos moleculares como: la

inhibición de la síntesis de ADN, la duplicación del ADN sobre un molde dañado y el rompimiento del ADN (Albertini y cols. 2000).

El Nucleosoma

Para empaquetar la información genética en el núcleo, la célula utiliza una familia de proteínas conservadas denominadas histonas; son proteínas básicas predominantemente globulares a excepción de sus colas. El nucleosoma es la unidad estructural básica de la compactación del ADN eucariótico, consta de 147pb de ADN envuelto 1,7 veces alrededor de un núcleo de proteínas histonas llamada “octámero”; constituido por un par de cuatro tipos diferentes: H2A, H2B, H3 y H4 (figura 3).

La estabilidad de este complejo permite mantener la accesibilidad necesaria para llevar a cabo procesos como la transcripción, duplicación y reparación; esta surge de varios tipos de interacciones no covalentes, considerando puentes de hidrógeno, enlaces electrostáticos e interacciones hidrofóbicas. Su montaje sigue un camino bien definido: primero 2 copias de histonas H3 y H4 se unen al ADN, formando un tetrasoma, para posteriormente unirse los dos dímeros de H2A y H2B (Vlijm y cols. 2015). Cada una de las subunidades es susceptible de modificaciones post-traduccionales (MPT) reguladas y altamente específicas, tales como acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación.

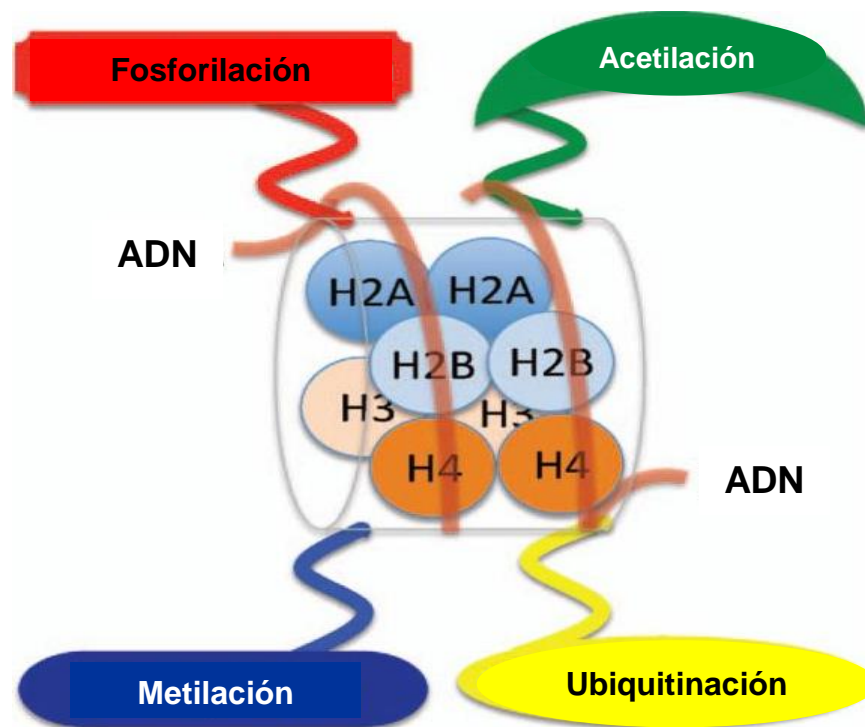


Figura 3. Nucleosoma eucariota. Consiste en ADN enrollado en secuencia en torno a cuatro al octámero de proteínas proteínas histonas. Se mencionan las modificaciones covalentes. (Hunt y cols. 2013).

La combinación de estas modificaciones dinámicas da como resultado el llamado 'código de histonas', que tiene un papel sobresaliente en la expresión génica, respuesta a lesiones de la información genética y su reparación.(Ausió y cols. 2002; Sone y cols. 2014).

Es importante resaltar que los cambios de fosforilación conjuntos en diversos residuos de aminoácidos, combinados con otras MPT, determinarán la función de la proteína, así como el destino celular. Se observan efectos menores cuando se dan modificaciones individuales (Kruse y cols. 2009; Meek y cols. 2009).

La histona H2AX

Existen formas variantes de histonas implicadas en la regulación de la transcripción (Ray-Gallet y cols. 2005; Bing y cols. 2007). A diferencia de las canónicas, las variantes de histonas se expresan fuera de la fase S del ciclo celular y se incorporan a la cromatina de forma independiente a la duplicación del ADN, para responder a distintas situaciones de la célula. Durante los últimos años, diferentes proteínas han sido identificadas como participantes tempranos en respuesta a daño al ADN, una de ellas es la variante H2AX, miembro de la familia H2A que representa el 10% aproximadamente de las moléculas totales de esta familia en fibroblastos humanos normales. (Sone y cols. 2014).

Identificada por primera vez en células humanas en la década de 1980, se le ha dado el nombre de histona guardián del genoma (Vardabasso y cols. 2014). Contiene un residuo C-terminal conservado que es fosforilado tras el daño genotóxico y tiene un papel represor de la transcripción (figura 4). Las modificaciones de la cromatina representan un nivel adicional de regulación para los procesos metabólicos del ADN como la transcripción, recombinación, reparación, duplicación, formación del centrómero, etc., actuando como medio donde se integran las señales biológicas y tienen lugar las respuestas moleculares (Kamakaka y cols. 2005; Ray-Gallet y cols. 2005; Sarma y cols. 2005).

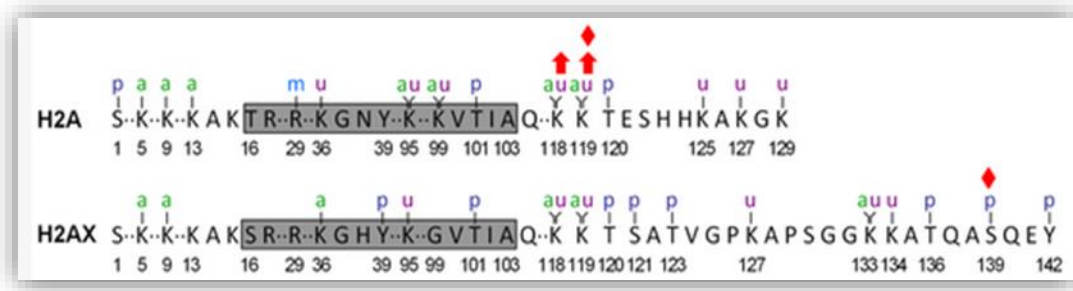


Figura 4. Diferencias entre H2A (histona canónica) y H2AX (variante). Se muestran sombreados los residuos en dominios globulares. Las modificaciones que se muestran encima de las secuencias de aminoácidos son: a→acetilación; m→metilación; p→fosforilación y u→ubiquitinación respectivamente. (Li 2012).

La fosforilación de la histona H2AX en la serina 139 (γ -H2AX, gH2AX) se produce en sitios contiguos al ADN donde hay rupturas de doble cadena. La detección de esta histona puede proporcionar una medida del número de DSBs dentro de una célula (Ismail y cols. 2007). Otros residuos como serina 16, treonina 136 y tirosina 142 son fosforilados en H2AX, lo cual, tiene diversos efectos en la estructura del nucleosoma (Vardabasso y cols. 2014).

La reparación de DSBs eficiente se basa en parte en la rápida formación de “focos” de la histona H2AX fosforilada en cada sitio de lesión, y el posterior reclutamiento de factores de reparación (figura 5). Lo anterior, puede ser visualizado con anticuerpos apropiados (Redon y cols. 2012).

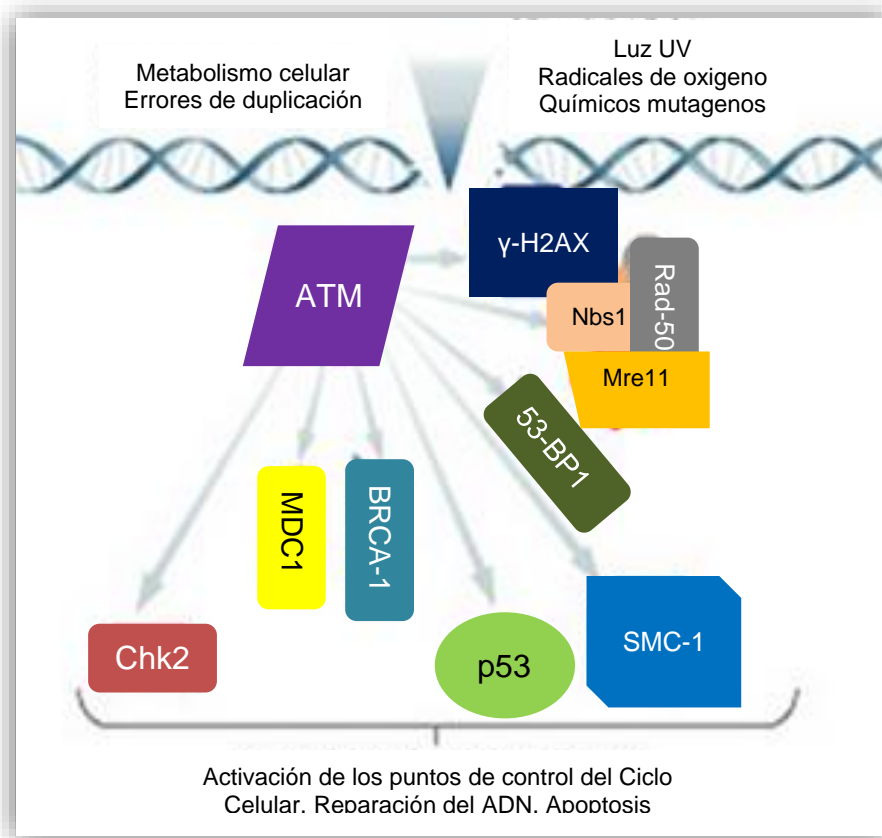


Figura 5. Reclutamiento de factores de reparación. ATM fosforila a H2AX, transformándola en γ -H2AX que se encarga de señalar el sitio de la lesión en el ADN. Posteriormente se convierte en el centro de incorporación del complejo de respuesta y reparación. Se encuentran proteínas como: BRCA-1 \rightarrow Proteína supresora de tumores, NBS1 y Rad50 \rightarrow Factores de reparación, 53-BP1 \rightarrow Importante para la fosforilación dada por ATM de p53 y SMC-1, MDC-1 \rightarrow Mediador de daño en el ADN en el punto de control 1. (R&D systems 2004).

Dos proteínas H2A están contenidas en un nucleosoma, en el que las cantidades de H2AX varían en función del tipo celular. Los porcentajes de H2AX en H2A son de aproximadamente 10% en los fibroblastos normales humanos, 2% en los linfocitos y las células HeLa, y 20% en el glioma humano línea de células tumorales

SF268. La razón para estas diferentes cantidades relativas de H2AX entre diferentes tipos celulares es desconocida. Sin embargo, aproximadamente 0.03% de la H2AX se fosforila por DSBs independientemente de su abundancia (Bonner y cols. 2008; Redon y cols. 2012).

La formación de γ -H2AX es proporcional a la cantidad de DSBs (figura 6), dando una correlación directa 1:1 al daño existente, por lo que presenta alta sensibilidad, precisión y expresión (Sedelnikova y cols. 2002).

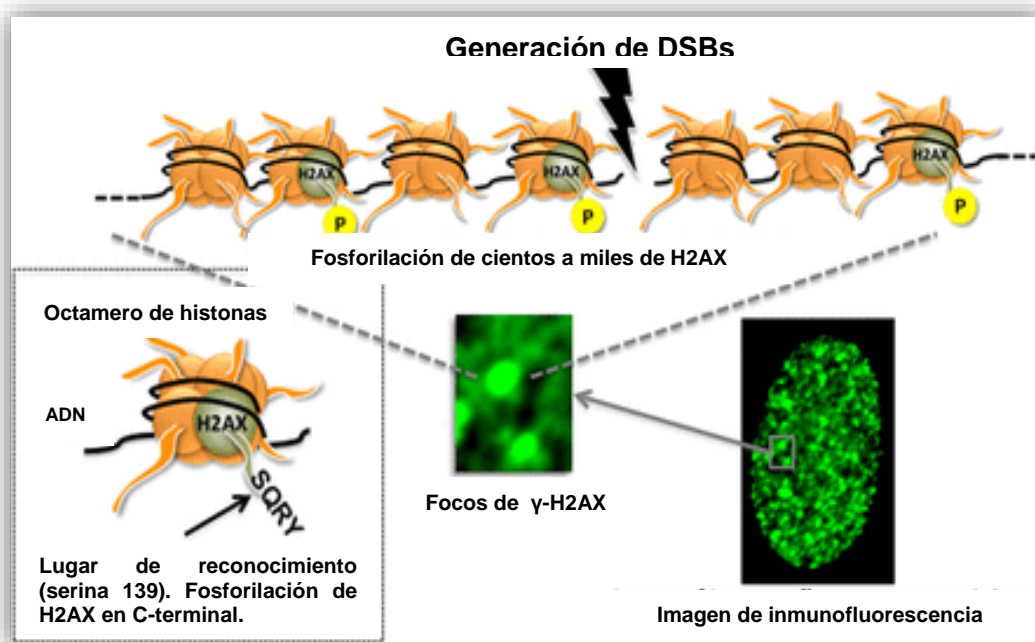


Figura 6. Fosforilación de la histona H2AX. (Ibuki y cols. 2014).

Después de la inducción de DSBs, la fosforilación de serina 139 comienza en cuestión de minutos, alcanzando una meseta alrededor de 30 min después de que ocurre el daño (Paull y cols. 2000). La fosforilación luego disminuye durante un período de horas (Garcia-Canton y cols. 2012).

El mecanismo de eliminación de γ -H2AX no ha sido dilucidado. Hay múltiples fosfatasa implicadas en la desfosforilación de γ -H2AX. Esta podría producirse directamente en la cromatina o podría ocurrir después de que la histona se ha desplazado de los nucleosomas (Chowdhury y cols. 2005; Redon y cols. 2011).

Ambos mecanismos podrían potencialmente ocurrir simultáneamente, independiente de la ubicación de H2AX fosforilada (Banerjee y cols. 2011). Se han considerado otros caminos que implican proteínas chaperonas de histonas en el proceso de eliminación de γ -H2AX (Bao 2011).

Los experimentos llevados a cabo por Keogh y cols. sugieren que la pérdida de H2AX fosforilada podría activarse no sólo por la reparación de DSBs, sino también por la activación de pasos que preceden la reparación (Keogh y cols. 2006).

Las causas de las rupturas de cadena doble pueden ser secundarias, ya sea por la colisión de las horquillas de duplicación en los sitios de daño al ADN, incluyendo bases oxidadas, aductos de ADN, roturas de una sola hebra (SSB), y entrecruzamientos, así como por la reparación de este daño (figura 7). (Ishihama y cols. 2008; Toyooka y cols. 2008; Toyooka y cols. 2009). Lo anterior, refiere que existe la posibilidad de que γ -H2AX sea un marcador para varios tipos de daño en el material genético. inducidas por mutágenos y carcinógenos (Ibuki y cols. 2014).

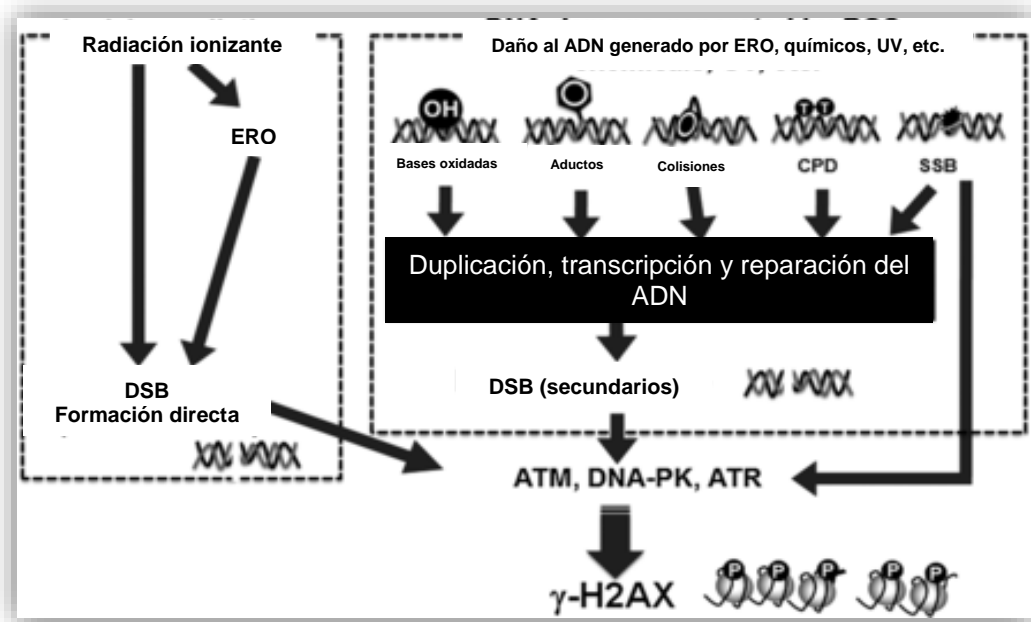


Figura 7. Vías de fosforilación de H2AX. γ -H2AX se forma a partir de DSB. La radiación ionizante se toma como promotor directo de DSB, mientras que su procedencia secundaria se le adjudica a bases oxidadas, aductos de ADN, colisión de horquillas de duplicación en los sitios de daño al material genético y su reparación (Ibuki y cols. 2014).

Las siguientes funciones se han sugerido para H2AX:

- Concentración de proteínas de señalización de daño al ADN y reparación de DSBs
- Amplificación de la señal y transducción para mejorar la sensibilidad del punto de control del ciclo celular G2 inducido por daño al ADN
- Reclutamiento de cohesinas para promover la reparación recombinante dependiente de cromátidas hermanas
- Remodelación de la cromatina para ayudar al procesamiento de DSBs

- Anclaje de la cromatina para evitar la disociación de los extremos finales y mejorar la fidelidad de reparación (Rothkamm y cols. 2009)

p53

Se trata de un gen supresor que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 banda 13, y codifica una proteína nuclear de 53 kD con una longitud de 393 aminoácidos.

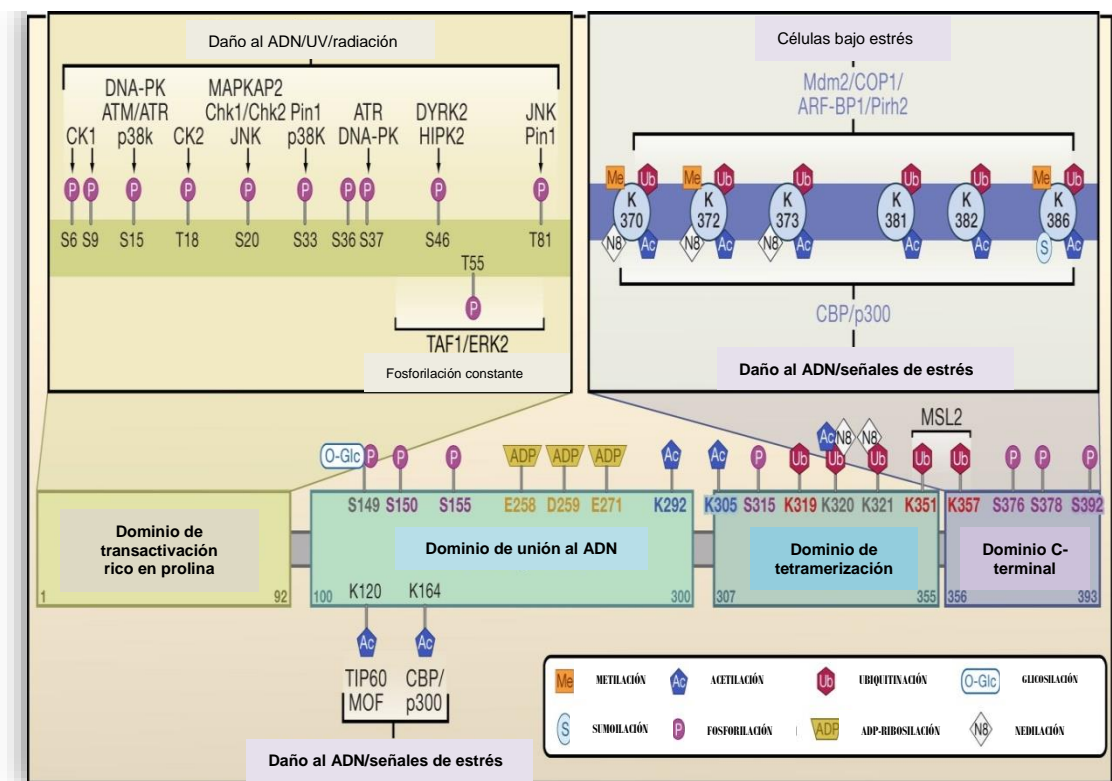


Figura 8. Modificaciones post-traduccionales de p53. Hasta el momento, se tiene conocimiento que más de 36 aminoácidos de esta proteína pueden ser modificados. (Kruse y cols. 2009).

Descubierta en 1979 (Kruse y cols. 2009), p53 es una proteína de unión al ADN que actúa como regulador del ciclo celular, interviniendo en el mantenimiento

de la integridad genética y es conocido popularmente como guardián del genoma. La activación de esta proteína se da por eventos como hipoxia, choque térmico, inanición, daño al ADN y otras señales de estrés (Saha y cols. 2014). Normalmente está presente en las células a niveles muy bajos, pero cuando se produce un daño en el material genético por diversos motivos como radiaciones o sustancias químicas, se acumula en el núcleo, ejerciendo acciones anti-oncogénicas. Se une a diversos sitios específicos de regulación de expresión de genes ocasionando que se produzcan proteínas que detienen el ciclo celular hasta que los mecanismos de reparación del ADN lo arreglen. Cuando el daño es muy grande e irreparable, p53 ejerce la otra función importante que tiene: inducir apoptosis en la célula dañada mediante la regulación de la transcripción de genes que producen proteínas involucradas en este proceso (Ryan y cols. 2001), utilizando la capacidad que tiene de reprimir o promover la expresión de más de cien genes distintos (Reed y cols. 2015).

Integrantes de la familia de p53 se encuentran también en invertebrados como insectos, gusanos y moluscos. Por ejemplo, p73 está implicado en el desarrollo del sistema nervioso central y el sistema inmunológico (Saha y cols. 2014). Este adepto puede actuar como un apoyo a p53 en respuesta a diversas señales de estrés (Yang y cols. 2000).

El aumento en la estabilidad de la proteína p53, su unión a los promotores de baja afinidad y asociación con otras proteínas, así como su actividad antiviral, y respuestas de control al daño del material genético y oncogenes activados, está dada por la acetilación que sufre (Tang y cols. 2008; Muñoz-Fontela y cols. 2011)

La proteína p53, también es fundamental para la implantación eficiente de los embriones en el útero en ratones (Belyi y cols. 2009).

Evidencia reciente, sugiere que la dinámica de la expresión de p53 desempeña un papel importante en la regulación diferencial del destino de la célula, sin embargo, se tiene poca información al respecto (Chen y cols. 2013).

JUSTIFICACIÓN

La DCP es un padecimiento que genera alteraciones en diversos niveles: conductual, bioquímico, celular, inmunológico y citogenético.

A nivel citogenético, se ha demostrado que la desnutrición grave produce aberraciones cromosómicas, alta frecuencia de MN, intercambio de cromátidas hermanas y daño al ADN; lo anterior, puede comprometer la funcionalidad de células, órganos y en consecuencia del organismo.

Aun cuando existe gran cantidad de estudios sobre la DCP, la información existente hasta el momento, resulta insuficiente en cuanto a sus consecuencias citogenéticas se refiere.

Es necesario sumar conocimiento en esta área, por lo que se requieren estudios complementarios para determinar las modificaciones más importantes relacionadas con su inicio y desarrollo.

Por otro lado, los efectos de la desnutrición moderada sobre el material genético han sido poco estudiados. Se ha mencionado que esta condición parece

generar alteraciones más profundas que la desnutrición grave, por lo que resulta sobresaliente desarrollar investigaciones que contribuyan a esclarecer las secuelas que este grado de desnutrición ocasiona en el ADN. Cabe resaltar, que lo anterior es de suma importancia, ya que es el grado de desnutrición que se presenta con mayor frecuencia.

Aunado a esto, es necesario desarrollar métodos sensibles y rápidos capaces de determinar los efectos citogenéticos de la desnutrición y el método de la detección inmunocitoquímica de la histona fosforilada H2AX para revelar la presencia de rupturas de doble cadena en el ADN utilizando citometría de flujo y microscopía confocal es una muy buena alternativa, ya que permite mediciones sensibles, objetivas y confiables.

Con lo anterior, se sustenta la necesidad de contribuir y continuar con estos estudios, utilizando métodos mucho más sensibles que arrojen luz al conocimiento preciso de las alteraciones vinculadas con la DCP. Por lo que, el propósito de esta investigación es conocer mejor los efectos de la desnutrición sobre el material genético.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la desnutrición sobre el reconocimiento eficiente por medio de la histona H2AX fosforilada de rupturas de doble cadena en el ADN?

HIPÓTESIS

Si la desnutrición calórico proteica en ratas lactantes provoca daño al ADN, entonces incrementará la proporción de la histona H2AX fosforilada en linfocitos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la desnutrición calórico proteica sobre el daño al ADN en linfocitos de ratas lactantes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar la expresión de la histona H2AX fosforilada por citometría de flujo.
- ❖ Evaluar la expresión de p53 como indicador de daño al ADN por citometría de flujo.
- ❖ Cuantificar el daño al ADN en linfocitos de sangre periférica, provocado por desnutrición experimental por electroforesis unicelular.
- ❖ Identificar daño al ADN a través de la expresión de la histona H2AX fosforilada mediante microscopía confocal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desnutrición experimental por competencia de alimento

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 de luz-obscuridad L12/O12, temperatura de 22-25°C y humedad relativa de 45%. Las madres fueron criadas con alimento balanceado para roedores (Alimento Purina Lab Chow 5001, Lab Diet con 23% de proteína).

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.

Se repartieron aleatoriamente a las crías al día siguiente de su nacimiento (al que se denomina día 1), en 2 lotes: Bien nutridas (Lote testigo), con 6 crías y Desnutridas (Lote experimental) con 16 crías.

Grado de desnutrición

Los promedios de peso corporal de las ratas Desnutridas y Bien nutridas se obtuvieron desde el día 1 hasta el día 21(destete), pesando las crías cada tercer día durante el experimento; esta información se utilizó para realizar el cálculo del déficit de peso de cada ejemplar. Dependiendo el déficit de peso en comparación con el lote testigo de la misma edad, se estableció el grado de desnutrición en el que se encontraban las ratas. Para el presente estudio, se utilizaron ratas de 2º y 3er grado.

Extracción de sangre

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. Se obtuvieron aproximadamente 500 µl de sangre por rata.

Marcaje de linfocitos T

Una vez obtenida la sangre de los ejemplares, se toman 150 µl añadiendo 2 µl de anticuerpo CD3 PE, se mezcló suavemente con ayuda de un agitador tipo vórtex y se dejó incubar 20 min. a 4°C en obscuridad. Posteriormente, se añadieron 2ml de solución de lisis, agitando suavemente con agitador tipo vórtex. Se dejó reposar 10 min. para realizar lavado. Este paso se repitió las veces necesarias (aprox. 3) hasta que la muestra pierde la coloración roja.

Posteriormente, se adicionó 1 ml de PBS para centrifugar a 500 rpm durante 5 min., desechando el sobrenadante. El paquete celular se colocó en 25 µl de PBS, fijándolo con 500 µl de metanol al 70% para guardar en refrigeración a -20°C de 2-24 hrs.

Viabilidad celular

Se midió la viabilidad de los linfocitos con azul tripano al 0.4% y cámara de Neubauer para contar las células. En células muertas, el azul tripano ingresa, observándose teñidas; por su parte las vivas se observan transparentes (sin teñir).

Para obtener el porcentaje de células vivas, ocupamos la fórmula siguiente:

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

Inducción de daño al ADN en linfocitos

Las células fueron tratadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 100 µM durante 1 hr, un agente genotóxico, para propiciar lesiones en el material genético.

Para establecer la concentración deseada, se combinaron 100ml de H₂O + 100 µl de H₂O₂ en un matraz aforado. Se agitó y se tomó 1 ml, se colocó en una celda para leer a 240 nm en el espectrofotómetro, arrojando un valor de Densidad óptica (D.O) de 0.030.

Se utilizó la siguiente fórmula para determinar la concentración:

$$\text{Molaridad} = \frac{D.O}{35.76} (1000)$$

$$\text{Molaridad} = \frac{0.030}{35.76} (1000)$$

Para inducir daño, las células se pusieron en contacto con 1 ml de H₂O₂ en la concentración y tiempo señalado anteriormente.

Posteriormente, se adicionó 1ml de PBS a las muestras con y sin H₂O₂.

Marcaje de H2AX fosforilada y p53

Para evidenciar la histona γ-H2AX y la proteína p53 fueron, la muestra se centrifugó a 500 rpm por 10 min, eliminando el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de una solución al 1% de albúmina en PBS durante 30 min.

Proseguimos a centrifugar nuevamente (esta vez durante 5 min.) para agregar 20 µl de anticuerpo anti-γ-H2AX FITC y 2 µl de anticuerpo primario anti-p53, agitando suavemente con vórtex, dejando reposar en frío y oscuridad durante 1 hr.

El siguiente paso es adicionar 1 ml de PBS, centrifugar y retirar sobrenadante (lavado).

Se agregaron 2 µl del anticuerpo secundario para p53 PerCP/Cy 5.5, mezclando suavemente, dejando reposar en frío y oscuridad durante 30 min. Se realiza otro lavado y los paquetes celulares se sitúan en 25 µl de PBS y se fijaron con 500 µl de Paraformaldehído (PAF) al 1%.

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se empleó el citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson®) con láser de argón y el paquete computacional Cell Quest (versión 3.0.1, 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 software WinMDI 2.8.

Selección de la región de análisis

La primera gráfica se realizó con Forward Scatter (FSC=tamaño) contra Side Scatter (SSC= complejidad interna) para establecer la región de células por analizar (figura 9 letra **A**).

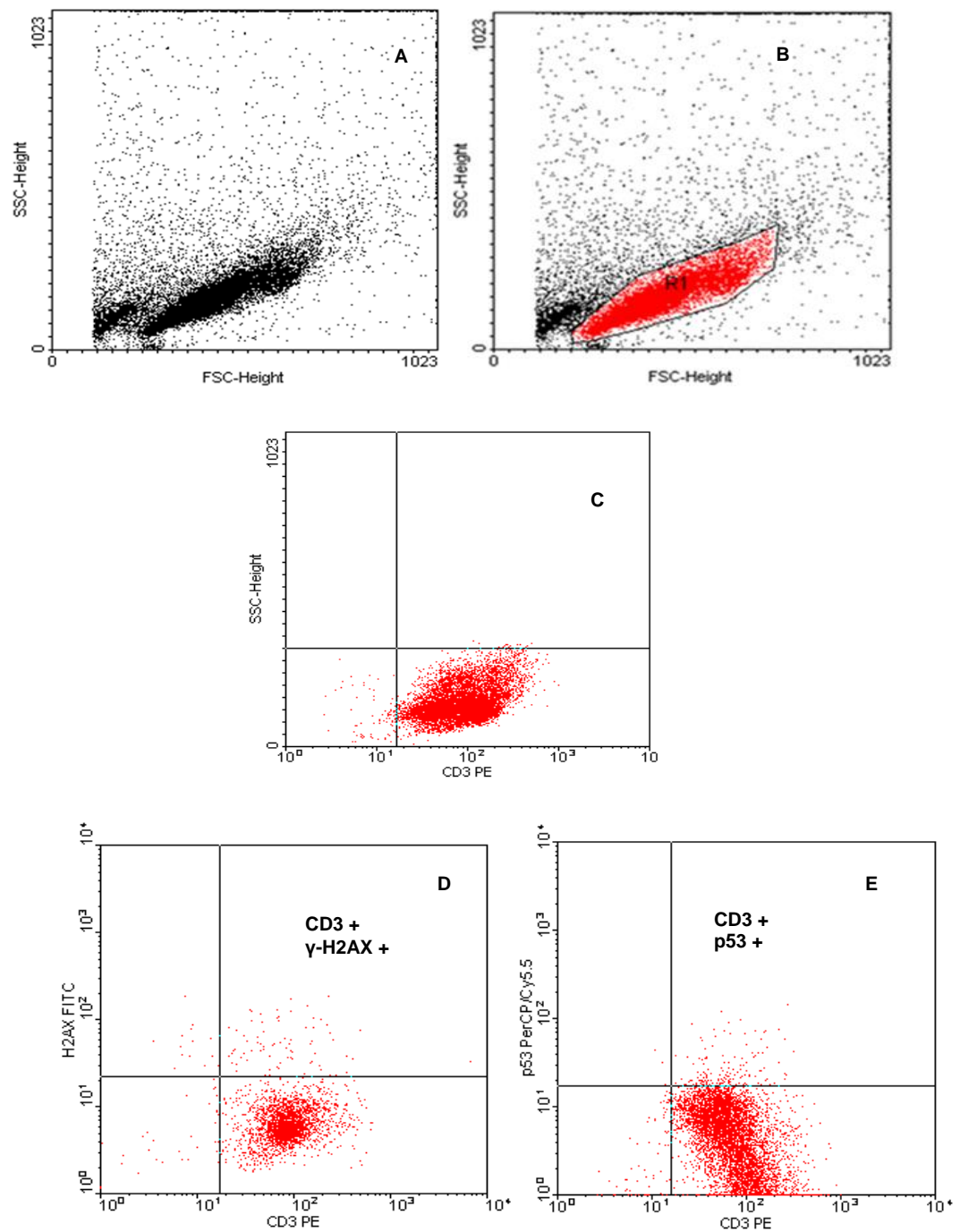


Figura 9. Estrategia de análisis. Se muestra las gráficas de punto (dot plot) en **B**: región de análisis de las células de interés (linfocitos), **C**: CD3 PE vs SSC, positivos en región inferior derecha; **D**: CD3 PE vs γ -H2AX FITC y **E**: CD3 PE vs p53 PerCP/Cy5.5 para obtener dobles positivos (región superior derecha).

MICROSCOPIA CONFOCAL

Para identificar daño al ADN, se utilizó un microscopio confocal modelo LSM (Microscopio de Barrido Láser) 780 NLO (Excitación no linear, excitación multifotónica) Observer Z.1, con láser de argón 456, 488 y 514 nm.

Separación de linfocitos en sangre

Una vez obtenida la sangre (500 μ l), con ayuda de una jeringa heparinizada, se vació en un tubo de poliestireno de 5 ml para realizar una dilución 1:1 con PBS.

En otro tubo se agregaron 0.5 ml de Lymphoprep® y sobre este, la sangre diluida, cuidando que no se mezclaran. Se centrifugó a 800 g's por 20 min a T ambiente (aprox 20 °C). Pasado este tiempo, se observó una banda blanca en la parte central del tubo, en la cual se localizaban las células mononucleares (figura 10).

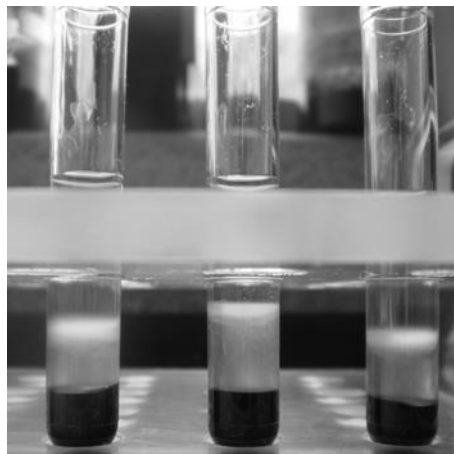


Figura 10. Separación de linfocitos utilizando Lymphoprep®. Posterior a la centrifugación, se observa una franja lechosa en la zona central de la muestra.

Después, empleando una pipeta Pasteur, se extrajeron los linfocitos, procurando tomar solamente la banda de interés. Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS, después se centrifugó a 250 g 10 min. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió el botón celular en PBS.

Marcaje de la muestra

Una vez obtenidos los linfocitos con Lymphoprep®, se agregaron 30 µl de DAPI (para confirmar la presencia de ADN en las células de interés), agitando suavemente con agitador tipo vórtex, dejando reposar 1 hr.

Posteriormente, se adicionó 1 ml de formalina neutra (NBF) y se dejó reposar 10 min. Se centrifugó posteriormente por 5 min a 500 rpm, desechando el sobrenadante.

Después, se añadió 1 µl de anticuerpo CD3 PE y se dejó incubar 20 min.; en seguida se realizó un lavado. Se procedió a agregar 2 µl de anticuerpo γ-H2AX FITC y esperamos 1 hr para realizar otro lavado.

Montaje de la muestra

Fue necesario lavar cuidadosamente los portaobjetos y cubreobjetos con jabón líquido neutro (Extran®), para posteriormente sumergirlos en alcohol al 70% y secarlos perfectamente con una gasa.

Se agregaron 20 µl de muestra por portaobjetos, incorporando el cubreobjetos, agregando las capas necesarias de esmalte transparente para sellar (aproximadamente 3). Se guardó en refrigeración y obscuridad hasta su lectura.

ENSAYO COMETA

Para complementar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, se empleó el método de electroforesis unicelular en condiciones alcalinas. Con esta técnica, al someter el material genético a un campo eléctrico, se pueden detectar rompimientos de cadena doble o de cadena sencilla. La imagen que se obtiene es semejante a la de un cometa (figura 11) en el que la cabeza es el nucleóide y el ADN fragmentado es la estela, cuya longitud refleja la cantidad de daño.

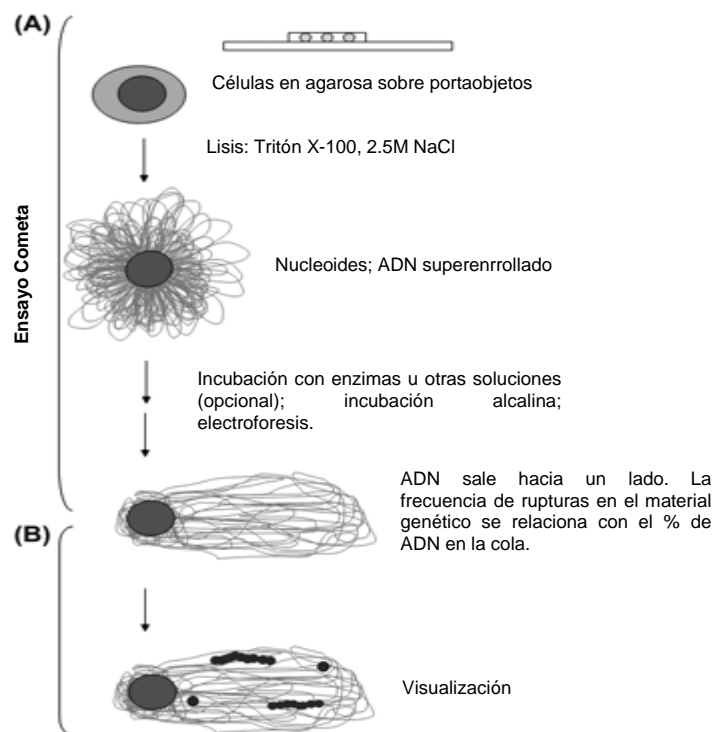


Figura 11. Principios generales de la prueba cometa (Halliwell 2000).

Preparación de las muestras

Se prepararon agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% y agarosa regular al 0.75% en PBS, sin calcio y magnesio. Para disolver, se calentaron en horno de microondas durante aproximadamente 30 segundos.

Se colocaron 120 μ l de agarosa regular en un portaobjetos esmerilado (Fisherfinest), se colocó un cubreobjetos (evitando formar burbujas) y se dejó solidificar. Posteriormente se removió el cubreobjetos, para agregar sobre el portaobjetos 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión conteniendo aproximadamente 10^5 células. Se colocó un cubreobjetos y se dejó enfriar. Se removió el cubreobjetos y se añadieron 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión y se dejó solidificar. Se retiró el cubreobjetos y la preparación se dejó inmersa en una solución de lisis. El cubreobjetos se removió y la preparación se dejó inmersa en una solución de lisis durante 1 hr a 4°C, preparada de la siguiente manera: NaCl 2.5 M, EDTA (Sigma) 100 mM y Tris (Sigma) 10 mM. Se llevó a un pH de 10 y se agregó Tritón X-100 (Sigma) al 1% (v/v) y DMSO al 10%.

Después, se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una caja de electroforesis horizontal, agregando amortiguador de electroforesis preparado con NaOH 300 mM y EDTA 1 mM en agua desionizada, de tal forma que la solución cubrió las preparaciones. Al exponer las muestras a un medio alcalino durante 20 minutos, se permitió el desenrollamiento del material genético.

Transcurrido el tiempo, se conectó la fuente de poder, ajustándola a 25 volts y 300 miliamperes, y se dejó correr la electroforesis durante 20 minutos. Posterior al tiempo de electroforesis, las preparaciones se retiraron de la cámara, se colocaron

en una superficie y se gotearon hasta que se cubrieron con amortiguador de neutralización (Tris 0.4 M, ajustando pH a 7.5), dejando reposar por 5 minutos. Este proceso se repitió dos veces más.

Tinción y observación de las muestras

La tinción de las electroforesis se realizó utilizando 70 µl de una solución de SYBR Green (100nM). Las células se observaron con el objetivo 40x en un microscopio de epifluorescencia Olympus modelo BX41.

El límite del nucleoide se tomó como punto de partida para medir la longitud de la cola, para lo cual, se usó el programa ImageJ.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis estadístico se efectuó utilizando la prueba Kruskal-Wallis para identificar diferencias entre los grupos de estudio, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Se empleó el programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Evaluación de la desnutrición experimental

En el cuadro 2 se muestra el peso de las ratas bien nutridas (BN) y desnutridas (DN) el día 21 (destete).

Cabe resaltar que en el momento de formar las camadas BN (testigo) y DN (experimental), el peso de las ratas contando con un día de nacimiento no mostraron diferencias significativas.

Cuadro 2. Peso de las ratas utilizadas (en gramos) el día 21.

BN	DN 2º grado	% Déficit	DN 3º grado	% Déficit
51.1	32.5	39.25	27.5	48.60
53	34.7	35.14	25.5	52.34
53.4	34.2	36.08	29.5	44.86
58.7	33.1	38.13	26.1	51.22
57.4	36.6	31.59	26.3	50.84
56	33	38.32	28.2	47.29
49.5	35.1	34.40	25.5	52.34
61.2	32.6	39.07	26.6	50.28
54	35.8	33.09	30.8	42.43
41.1	38	28.98	30.3	43.37
50.1	37.9	29.16	29.6	44.67
50.6	39.5	26.17	25.5	52.34
52	33.2	37.95	28.8	46.17
57.3	34.5	35.52	31	42.06
52.6	32.2	39.82	30.4	43.18
58.1	32.3	39.63	27.5	48.60
	32.7	38.88	29.1	45.61
	36.8	31.22	30.6	42.81
	33.7	37.01	31.5	41.12
			30.5	42.99
53.5±4.7*	34.6±2.2*	35.2±4.1*	28.5±2*	46.6±3.8*

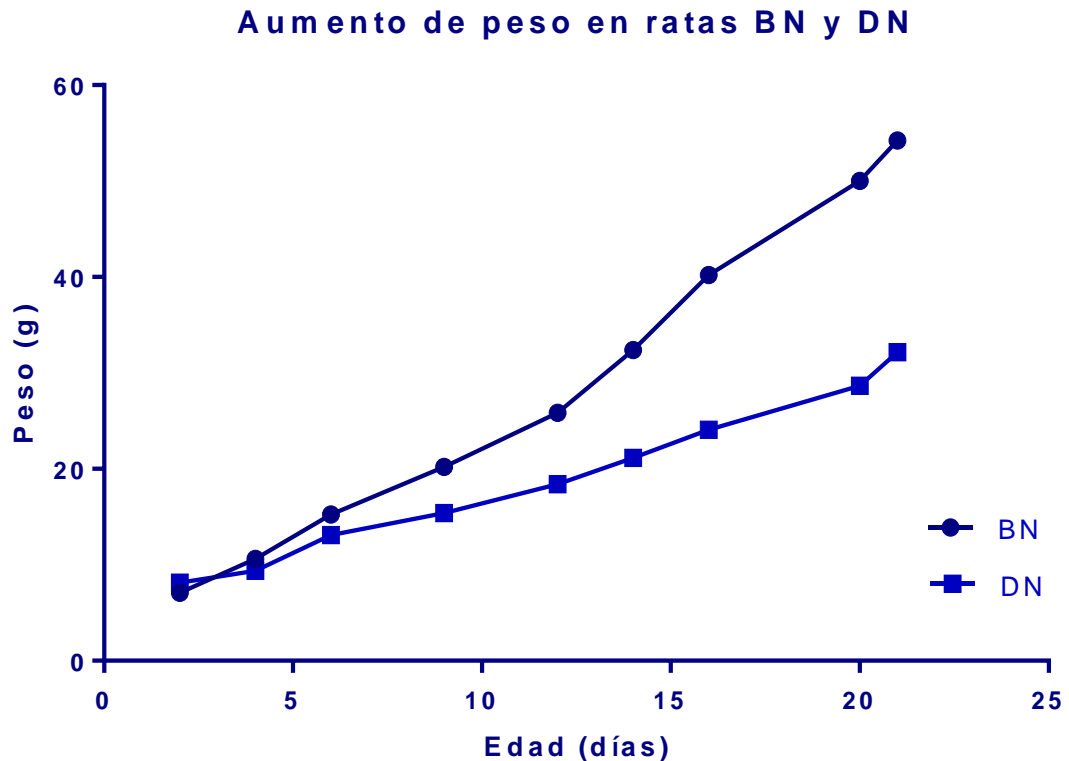
Ratas bien nutridas (BN), desnutrición moderada (DN2º) y grave (DN3º).

* Promedio ± desviación estándar de cada grupo.

La valoración del procedimiento de inducción de desnutrición experimental durante la lactancia con respecto al aumento en el peso corporal aporta la siguiente información: las ratas desnutridas de tercer grado tuvieron un déficit de peso del 40% o más con respecto a las bien nutridas. El peso promedio de las ratas BN fue de

53.5±4.7; el de las ratas con desnutrición moderada fue de 34.6±2.2 y las ratas con desnutrición grave presentaron un promedio de 28.5±2, lo que indica un déficit promedio de 35.2±4.1 en ratas con DN de 2º grado, que parte de 26.1 a 39.2 %; en el caso de DN de 3º grado, el déficit promedio es de 46.6±3.8, con un intervalo de 41.1 a 52.3 %. Lo anterior, nos muestra que el método utilizado para inducir desnutrición, permite obtener ratas con diferentes grados de la misma.

La gráfica 1 muestra la curva de aumento de peso en las ratas durante los 21 días. Mientras transcurre el periodo de lactancia hasta llegar al día 21 (destete), existe un incremento de peso menor en el grupo experimental (DN), en comparación al grupo testigo (BN).



Gráfica 1. Aumento de peso en ratas. Promedio de los pesos del lote testigo (BN) y experimental (DN) por día de edad, siendo el peso de las ratas DN significativamente menor al de las ratas BN ($p \leq 0.05$).

Viabilidad

La viabilidad se midió en todas las muestras, en todos los grupos BN, DN con y sin H_2O_2 . En los grupos tratados con peróxido, el porcentaje de células disminuyó a un 80%, en los grupos restantes, se observó una alta viabilidad, con un porcentaje mayor o igual al 90 % de células vivas.

Citometría de Flujo

En el cuadro 3 se muestra el porcentaje de linfocitos γ -H2AX positivos en cada uno de los grupos. Se observó que el porcentaje de células CD3+ (linfocitos) que

expresaron la histona fosforilada fue significativamente mayor en los grupos de ratas desnutridas de 2° y 3^{er} grado en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno.

Cuadro 3. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+.

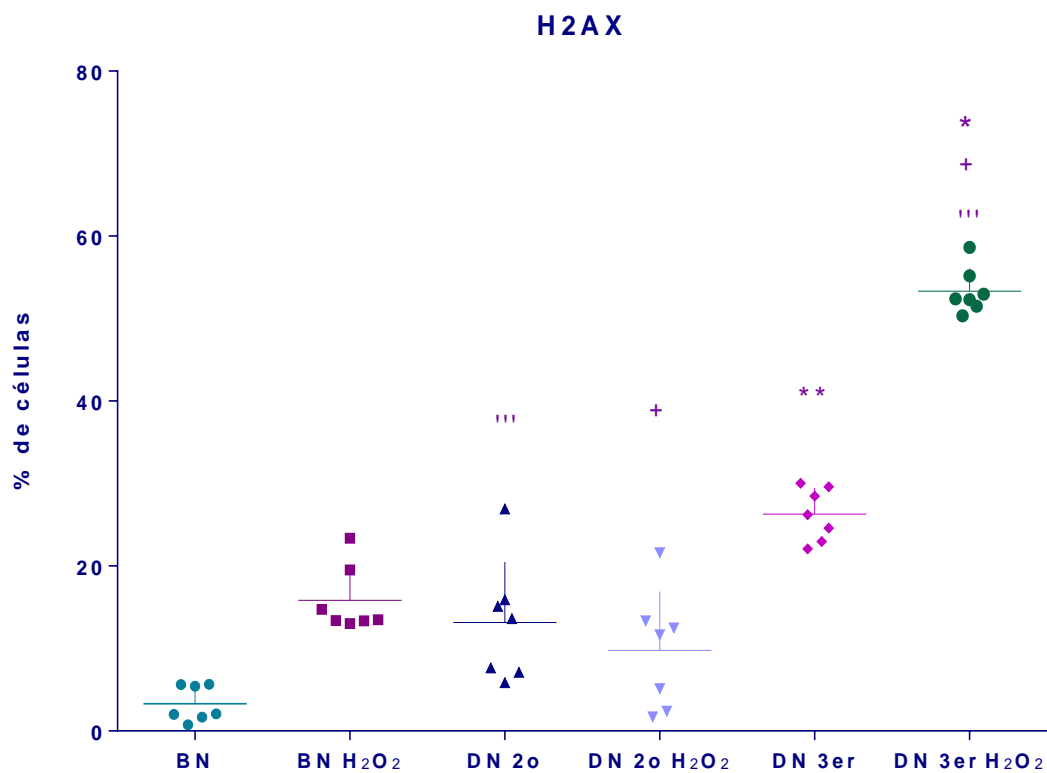
BN	BN H ₂ O ₂	DN 2°	DN2°H ₂ O ₂	DN 3 ^{er}	DN3 ^{er} H ₂ O ₂
5.43	13.37	15.11	13.35	28.47	52.4
5.64	19.51	15.91	11.65	22.96	52.95
2	23.38	13.6	12.5	29.59	52.28
0.73	13.49	26.92	21.6	24.58	51.5
2.06	14.74	5.85	1.72	22.07	50.32
1.68	13.03	7.65	5.14	26.23	58.61
5.61	13.36	7.13	2.4	30.02	55.18
3.3±2.1*	15.8±4*	13.1±7.3*	9.7±7.1*	26.2±3.1*	53.3±2.7*

Ratas bien nutridas (BN), desnutrición moderada (DN2°) y grave (DN3^{er}) y los tres en presencia de peróxido: (BNH₂O₂), (DN2°H₂O₂), (DN3^{er}H₂O₂).

* Promedio \pm desviación estándar de cada grupo de estudio.

Las cifras obtenidas por citometría de flujo (cuadro 3) relativas al porcentaje de linfocitos γ -H2AX positivos mostraron lo siguiente: ratas propias del grupo BN registraron un promedio de 3.30±2.15, con un intervalo que parte de 0.73 a 5.61%, y el grupo BN en presencia de peróxido (BNH₂O₂), tiene un promedio de 15.84±4.02 con un intervalo que parte de 13.03 a 23.38% de células; el grupo DN2° mostró uno

de 13.16 ± 7.31 con valores que van de 5.85 a 26.92%, y el grupo DN2° con peróxido (DN2°H₂O₂) tiene un promedio de 9.76 ± 7.12 , que va de 2.4 a 21.6% de células. El promedio del grupo DN3^{er} fue de 26.27 ± 3.19 , con un intervalo de 22.07 a 30.02%, y el grupo DN3^{er} en presencia de peróxido (DN3^{er}H₂O₂) exhibió un promedio de 53.32 ± 2.76 (el más alto de los seis grupos), con valores que van de 50.32 a 58.61% de células.



Gráfica 2. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+. Promedio de los valores obtenidos por citometría de flujo del lote testigo (BN) y experimental (DN) con tratamiento y sin tratamiento de H₂O₂, el día 21 (destete). Diferencias significativas: BN vs DN3^{er**} y DN3^{er}H₂O₂^{*}, DN2° vs DN3^{er}H₂O₂^{'''} y DN2°H₂O₂ vs DN3^{er}H₂O₂⁺ ($p \leq 0.05$). $n=7$.

En el cuadro 4 se muestra el porcentaje de linfocitos positivos a p53 en cada uno de los grupos. Se observó que el porcentaje de células CD3+ (linfocitos) que expresaron esta proteína fue significativamente menor, particularmente en los grupos de ratas desnutridas de 3^{er} grado con y sin peróxido de hidrógeno.

Cuadro 4. Porcentaje de linfocitos p53+.

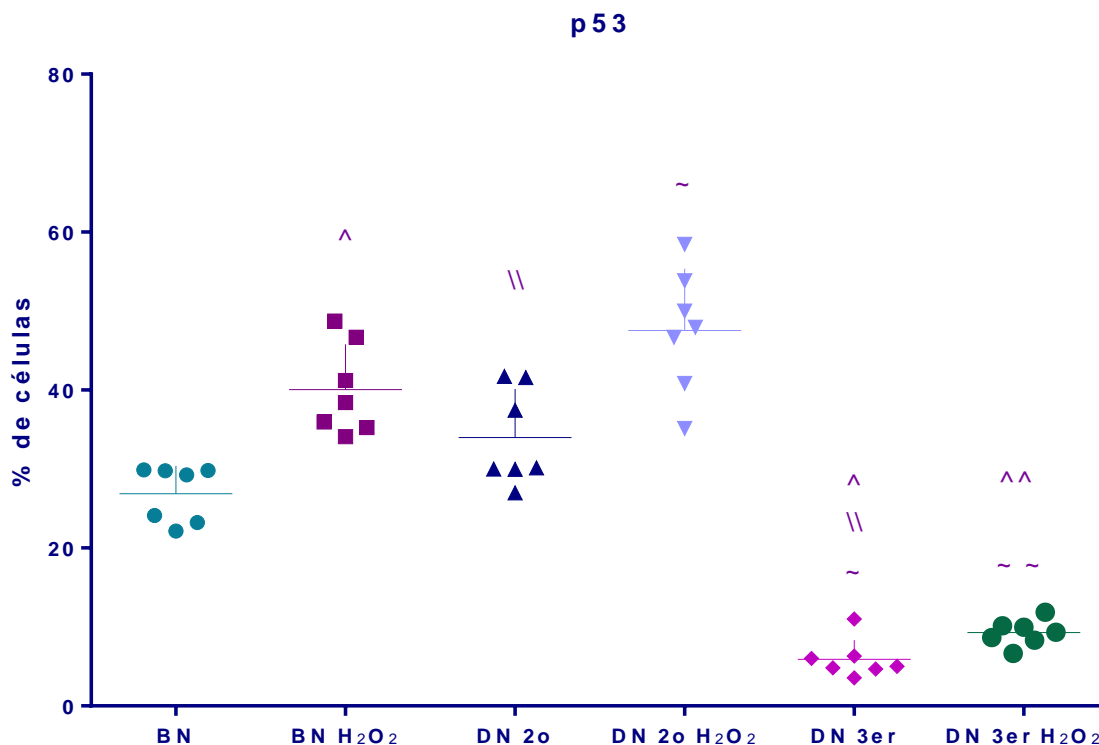
BN	BN H₂O₂	DN 2^o	DN2^oH₂O₂	DN 3^{er}	DN3^{er}H₂O₂
29.87	34.08	29.97	47.95	5	6.64
29.77	41.21	41.58	53.83	3.54	8.32
23.21	48.72	30.01	46.67	10.99	8.65
24.11	38.42	37.46	58.45	6.03	9.32
29.8	46.7	41.75	35.13	6.3	9.97
29.26	35.97	30.16	40.85	4.83	11.88
22.16	35.25	26.98	50	4.69	10.14
26.8±3.5*	40±5.7*	33.9±6.1*	47.5±7.7*	5.9±2.4*	9.2±1.6*

Ratas bien nutridas (BN), desnutrición moderada (DN2^o) y grave (DN3^{er}) y los tres en presencia de peróxido: (BNH₂O₂), (DN2^oH₂O₂), (DN3^{er}H₂O₂).

* Promedio ± desviación estándar de cada grupo de estudio.

Las cantidades adquiridas por citometría de flujo respecto al porcentaje de linfocitos p53+ (cuadro 4) mostraron lo siguiente: el grupo BN mostró un promedio de 26.9±3.5, con valores que parten de 22.16 a 29.87% y el promedio del grupo BNH₂O₂ es de 40.05±5.75, contando con un intervalo que va de 34.08 a 48.72% de células; el grupo DN2^o mostró uno de 34±6.13 presentando un intervalo de 26.98 a 41.75%

células, y el grupo DN2^oH₂O₂ registró un promedio de 47.55±7.79 (el más alto de los seis grupos) con cifras que van de 35.13 a 58.45% de células. El promedio del grupo DN3^{er} es de 5.91±2.41, con un intervalo de 3.54 a 10.99%, y el grupo DN3^{er}H₂O₂ tiene un promedio de 9.27±1.64, con valores que van de 6.68 a 11.88% de células.



Gráfica 3. Porcentaje de linfocitos p53+. Promedio de los valores obtenidos por citometría de flujo del lote testigo (BN) y experimental (DN) con tratamiento y sin tratamiento de H₂O₂, el día 21 (destete). Diferencias significativas: DN2^o vs DN3^{er} \\, DN2^oH₂O₂ vs DN3^{er} ~ y DN3^{er}H₂O₂ ~~, DN3^{er} vs BNH₂O₂ ^ y DN3^{er}H₂O₂ vs BNH₂O₂ ^^ (p≤0.05). n=7.

En el cuadro 6 se muestra el porcentaje de linfocitos γ-H2AX+ y p53+ en cada uno de los grupos. Se observó que el porcentaje de células que expresaron ambas

proteínas fue significativamente mayor en los grupos de ratas desnutridas de 2º grado con y sin peróxido de hidrógeno.

Cuadro 5. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+ y p53+.

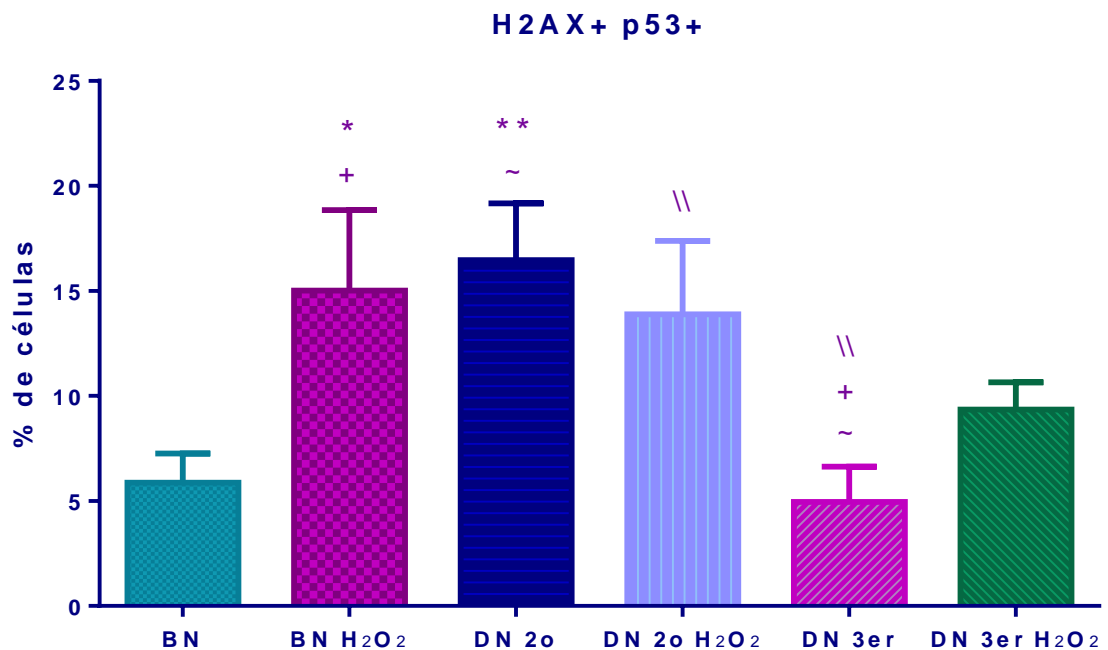
BN	BN H ₂ O ₂	DN 2º	DN2ºH ₂ O ₂	DN 3 ^{er}	DN3 ^{er} H ₂ O ₂
5.18	14.31	16.51	14.33	3.21	7.06
5.28	10.43	17.03	12.58	3.59	8.77
5.83	22.95	14.71	13.46	8.27	9.03
4.69	14.17	21.5	21.16	4.09	9.4
5.9	15.38	12.62	10.61	5.11	10.08
5.25	13.73	16.89	13.87	5.12	11.3
8.9	14.14	15.98	11.2	5.33	9.75
5.86±1.4*	15.01±3.8*	16.46±2.7*	13.88±3.4*	4.96±1.6*	9.34±1.3*

Ratas bien nutridas (BN), desnutrición moderada (DN2º) y grave (DN3^{er}) y los tres en presencia de peróxido: (BNH₂O₂), (DN2ºH₂O₂), (DN3^{er}H₂O₂).

* Promedio ± desviación estándar de cada grupo de estudio.

En el análisis realizado por citometría de flujo, se encontró que el porcentaje de linfocitos γ -H2AX y p53 positivos (cuadro 5) muestra lo siguiente: el grupo BN tuvo un promedio de 5.86±1.40, con valores que van de 4.69 a 8.9% y el promedio del grupo BNH₂O₂ es de 15.01±3.82, con un intervalo que va de 10.43 a 22.95% de células; el grupo DN2º presentó uno de 16.46±2.70 (el más alto de los seis grupos)

con un intervalo de 12.62 a 21.5%, y el grupo DN2^oH₂O₂ tiene un promedio de 13.88±3.48 con valores que parten de 10.61 a 21.16% de células. El promedio del grupo DN3^{er} es de 4.96±1.67, con un intervalo que va de 3.21 a 8.27%, y el grupo DN3^{er}H₂O₂ tiene un promedio de 9.34±1.30, con valores que van de 7.06 a 11.3% de células.



Gráfica 4. Porcentaje de linfocitos γ -H2AX+ y p53+. Promedio de los valores obtenidos por citometría de flujo del lote testigo (BN) y experimental (DN) con tratamiento y sin tratamiento de H₂O₂, el día 21 (destete). Diferencias significativas: BN vs DN2^o** , BN vs BNH₂O₂* , DN2^o vs DN3^{er} ~ , DN2^oH₂O₂ vs DN3^{er} // y DN3^{er} vs BNH₂O₂ + (p≤0.05). n=7.

Microscopía Confocal

El cuadro 6 muestra la intensidad de fluorescencia de γ -H2AX en linfocitos para cada uno de los grupos. Se observó que la intensidad de fluorescencia en linfocitos fue

significativamente mayor en el grupo de ratas desnutridas de 2º grado sin peróxido y de 3º grado en presencia de H₂O₂.

Cuadro 6. Intensidad de fluorescencia de γ -H2AX en linfocitos.

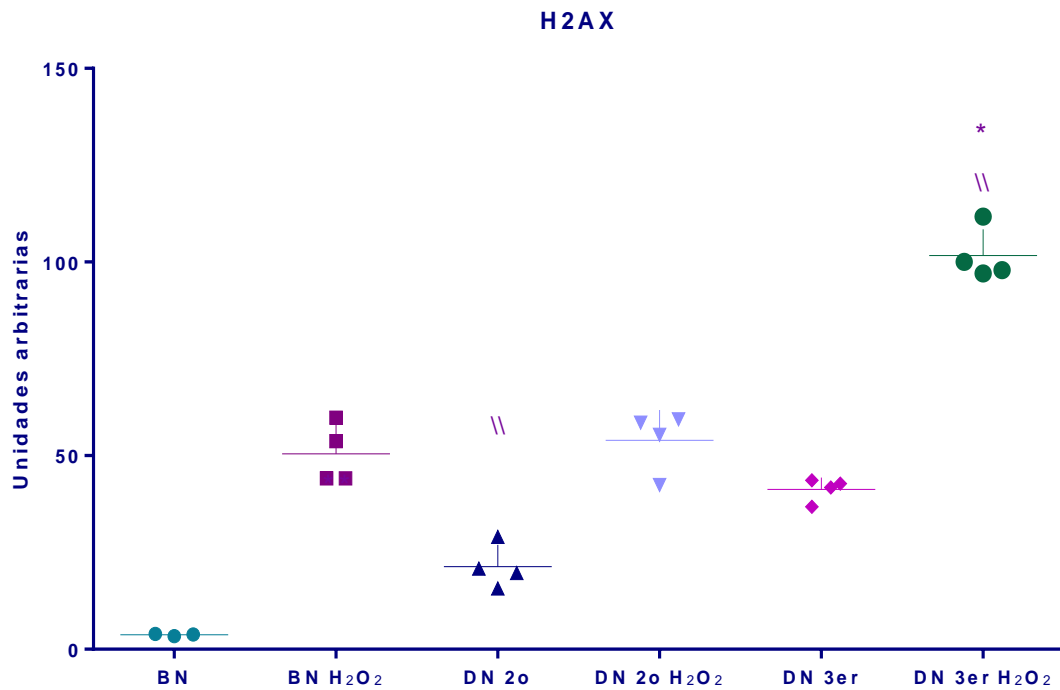
BN	BN H₂O₂	DN 2º	DN 2º H₂O₂	DN 3º	DN 3º H₂O₂
3.84	44.15	19.72	55.39	41.80	97.01
3.96	53.72	29.03	42.39	42.79	97.90
3.35	59.78	20.86	59.38	43.62	100.01
	44.14	15.67	58.49	36.77	111.68
3.72±0.3*	50.45±7.6*	21.32±5.6*	53.91±7.8*	41.24±3*	101.65±6.8*

Ratas bien nutridas (BN), desnutrición moderada (DN2º) y grave (DN3º) y los tres en presencia de peróxido: (BNH₂O₂), (DN2ºH₂O₂), (DN3ºH₂O₂).

* Promedio ± desviación estándar de cada grupo de estudio.

Los valores obtenidos por microscopía confocal (cuadro 6) respecto a la intensidad de fluorescencia en linfocitos mostraron lo siguiente: el grupo BN tuvo un promedio de 3.72±0.3, con valores que van de 3.35 a 3.96 y el promedio del grupo BNH₂O₂ fue de 50.45±7.68, con un intervalo que va de 44.14 a 59.78 expresado en unidades arbitrarias.; el grupo DN2º presentó uno de 21.32±5.6 con un intervalo de 15.67 a 29.03, y el grupo DN2ºH₂O₂ tiene un promedio de 53.91±7.8 con valores que parten de 42.39 a 59.38 unidades arbitrarias. El promedio del grupo DN3º fue de

41.24±3, con un intervalo que va de 36.77 a 43.62, y el grupo DN3^{er}H₂O₂ exhibió un promedio de 101.65±6.8 (el más alto de los seis grupos), con valores que van de 97.01 a 111.68 unidades arbitrarias.



Gráfica 5. Intensidad de fluorescencia de γ -H2AX en linfocitos. Promedio de los valores obtenidos por microscopía confocal del lote testigo (BN) y experimental (DN) con tratamiento y sin tratamiento de H₂O₂, el día 21 (destete). Diferencias significativas: BN vs DN3^{er}H₂O₂* y DN2^o vs DN3^{er}H₂O₂ \\\ (p≤0.05). n=4.

Ensayo Cometa

Para clasificar el grado de daño al ADN de los nucleoides en linfocitos, se utilizó la siguiente información (Cortés 1997):

NIVEL DE DAÑO	µm
Sin daño	0-20
Bajo	21-40
Moderado	41-60
Alto	≥ 61

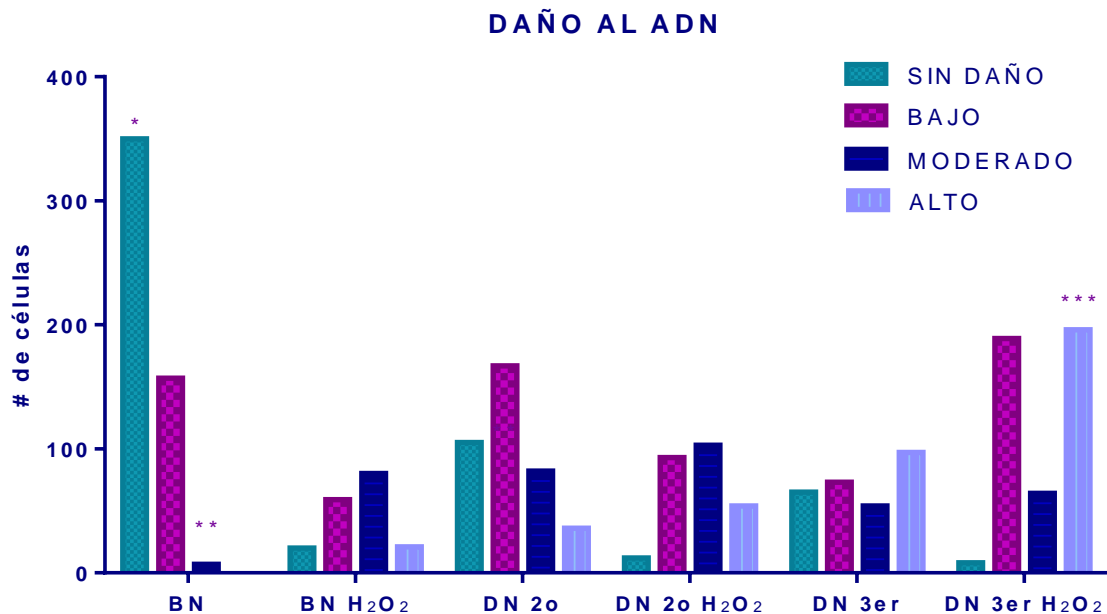
En el cuadro 7 se muestra la proporción de cometas presentes en linfocitos en cada uno de los grupos. Se observó que el número más alto de nucleoides sin daño lo mostró el lote BN, mientras que la cifra mayor en cuanto a cometas con daño alto, la obtuvo el grupo DN3^{er}H₂O₂.

Cuadro 7. Proporción de cometas presentes en linfocitos.

	BN	BN H₂O₂	DN 2º	DN 2º H₂O₂	DN 3^{er}	DN 3^{er} H₂O₂
SIN DAÑO	350	20	105	12	65	8
BAJO	157	59	167	93	73	189
MODERADO	7	80	82	103	54	64
ALTO	0	21	36	54	97	196

La proporción de nucleoides obtenida por electroforesis unicelular de linfocitos (cuadro 7) señala lo siguiente: el grupo BN presentó 350 nucleoides clasificados sin daño, 157 con daño bajo y 7 con daño moderado, el grupo BNH₂O₂ mostró 20 nucleoides sin daño, con daño bajo 59, 80 con daño moderado y con daño alto 21; por su parte el DN2º expuso 105 nucleoides sin daño, 167 con daño bajo, 82 con daño moderado y 36 con daño alto, el grupo DN2ºH₂O₂ reveló 12 nucleoides sin daño, con daño bajo 93, 103 con daño moderado y 54 con daño alto. El grupo DN3^{er}

mostró 65 nucleoides sin daño, con daño bajo 73, 54 con daño moderado y 97 con daño alto y el grupo DN3^{er}H₂O₂ presentó 8 nucleoides sin daño, 189 con daño bajo, 64 con daño moderado y 196 con daño alto.



Gráfica 6. Proporción de nucleoides obtenido por electroforesis unicelular del lote testigo (BN) y experimental (DN) con tratamiento y sin tratamiento de H₂O₂, el día 21 (destete). Diferencias significativas: BN sin daño*, BN daño moderado**, DN3^{er}H₂O₂ daño alto*** ($p \leq 0.05$). $n=7$.

En el cuadro 8 se muestra el promedio de la migración de los cometas presentes en linfocitos en cada uno de los grupos. Se observó que la cifra más alta de migración de cometas con daño alto la mostró el lote DN3^{er}H₂O₂, mientras que la menor migración de nucleoides, la obtuvo el grupo BN.

Cuadro 8. Promedio de migración en cometas de linfocitos

	SIN DAÑO	BAJO	MODERADO	ALTO
BN	12.93±1.4*	24.23±2.2*	42±1*	/
BN H₂O₂	16.26±1	26.53±2.2	42.61±1.9	66.5±4*
DN 2^o	17.93±1.5	30.53±1.2	45.46±1.4	84.13±5.4
DN 2^o H₂O₂	18±1.3	34.2±2.6	54.4±1.4	97.6±3.4
DN 3^{er}	20±0.6	36.13±2.6	58±1.2	117.73±3.7
DN 3^{er} H₂O₂	20.2±0.6	40±0.8	59.73±1.5	146.27±4.7

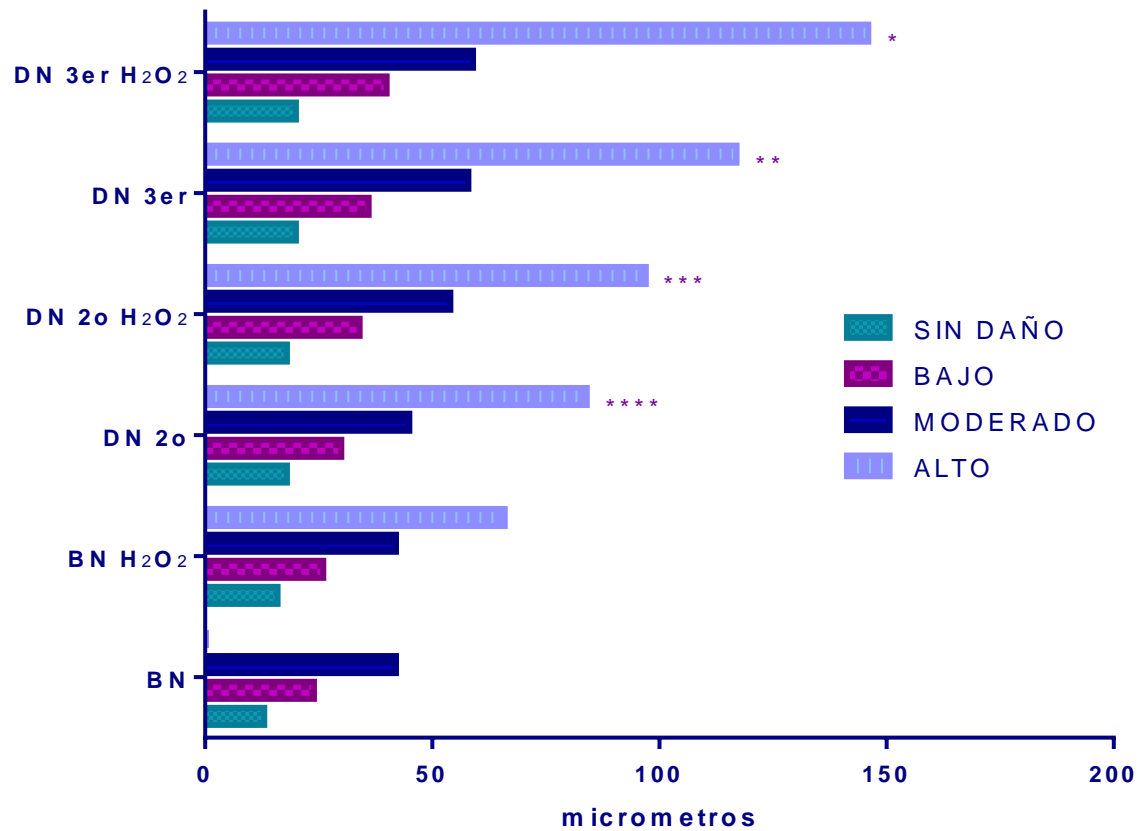
Ratas bien nutridas (BN), desnutrición moderada (DN2^o) y grave (DN3^{er}) y los tres en presencia de peróxido: (BNH₂O₂), (DN2^oH₂O₂), (DN3^{er}H₂O₂).

* Promedio ± desviación estándar de cada grupo de estudio.

El promedio de cometas obtenidos por electroforesis unicelular (cuadro 8) en linfocitos mostraron lo siguiente: el grupo BN tuvo un promedio de 12.93±1.4 µm en los nucleoides sin daño, con valores que van de 11.3 a 14.7; en los cometas de daño bajo uno de 24.23±2.2, con un intervalo que va de 21 a 26.4 y los cometas de daño moderado tuvieron un promedio de 42±1 con valores que parten de 41 a 43.2 µm.

El promedio del grupo BNH₂O₂ fue de 16.26±1 en nucleoides sin daño, con un intervalo que va de 15.1 a 17.3; los de daño bajo mostraron uno de 26.53±2.2 con un intervalo de 24 a 28 µm; nucleoides con daño moderado obtuvieron 42.61±1.9, con valores que parten de 41.3 a 44.8 y los de daño alto mostraron 66.5±4 de promedio con un intervalo de 62.4 a 70.4 µm. El grupo DN2^o mostró un promedio de 17.93±1.5 en nucleoides sin daño, con valores que van de 16.4 a 19.5; los de daño bajo uno de 30.53±1.2, con un intervalo que va de 29.6 a 32 µm; nucleoides con daño moderado tuvieron un promedio de 45.46±1.4, con un valores que van de 44 a 46.8 y con daño alto mostraron uno de 84.13±5.4, con un intervalo de 80.8 a 90.4

μm . El grupo DN2^oH₂O₂ presentó un promedio de 18 ± 1.3 en nucleoides clasificados sin daño, con valores que van de 16.5 a 19.2; los de daño bajo mostraron uno de 34.2 ± 2.6 con un intervalo de 32 a 37.2 μm ; nucleoides con daño moderado presentaron un promedio de 54.4 ± 1.4 , con valores que van de 52.8 a 55.6 y los de daño alto 97.6 ± 3.4 con un intervalo que va de 95.2 a 101.6 μm . Por otro lado, el grupo DN3^{er} obtuvo un promedio de 20 ± 0.6 en nucleoides sin daño, con un intervalo de 19.6 a 20.8; los de daño bajo presentaron uno de 36.13 ± 2.6 μm , con valores que van de 33.2 a 38.4; con daño moderado mostraron un promedio de 58 ± 1.2 , con un intervalo de 56.8 a 5.2 y los de daño alto 117.73 ± 3.7 , con cifras que van de 113.6 a 120.8 μm . El promedio del grupo DN3^{er}H₂O₂ en nucleoides sin daño fue de 20.2 ± 0.6 , con un intervalo que va de 19.6 a 20.9; los de daño bajo tuvieron uno de 40 ± 0.8 μm con valores que van de 39 a 40.8; con daño moderado obtuvo un promedio de 59.73 ± 1.5 con valores que van de 58 a 60.8 y los de daño alto ostentaron uno de 146.27 ± 4.7 , con cifras que van de 140.8 a 149.6 μm .



Gráfica 7. Promedio de migración en cometas obtenido por electroforesis unicelular de linfocitos del lote testigo (BN) y experimental (DN) con tratamiento y sin tratamiento de H₂O₂, el día 21 (destete). Diferencias significativas: BN vs DN^{3er}H₂O₂*, DN^{3er}** , DN^{2o}H₂O₂*** y DN^{2o}****. (p≤0.05). n=7.

DISCUSIÓN

Los modelos animales de experimentación contribuyen de forma muy importante en la realización de investigación, concediendo la posibilidad de realizar predicciones.

Se indujo la desnutrición en las ratas durante la lactancia, dado que esta etapa en ellas, representaría la niñez en humanos, permitiéndonos visualizar su repercusión. El método utilizado para provocar desnutrición (competencia de alimento) es apropiado para evaluar los efectos de la DCP por sí misma, pues se controlan variables como la ingesta de algún medicamento o la existencia de alguna infección, ya que estos factores comúnmente presentados se asocian la desnutrición. Sumado a lo anterior, este procedimiento aporta ratas con un déficit de peso mayor al 40% (con desnutrición grave o de 3^{er} grado), así como ejemplares con desnutrición moderada (2^o grado).

El bajo peso y talla en las ratas DN es debido a la baja ingesta de leche materna por cada una de ellas.

Existe información que sustenta que la DCP disminuye el número de unidades formadoras de colonias granulomonocíticas, acarreando daño ADN y alteraciones citogenéticas. Por el momento, los mecanismos exactos que provocan lo mencionado anteriormente, es poco claro (Rey y cols. 2000; Cortés y cols. 2001; Olmos y cols. 2001). Así mismo, se observa un aumento en el tiempo necesario para llevar a cabo un ciclo celular, descenso en la capacidad proliferativa en bazo y

médula ósea y una caída en el número de células pluripotenciales (Borelli y cols. 2009).

El presente trabajo consideró de vital importancia analizar la expresión de la histona H2AX fosforilada en linfocitos provenientes de ratas desnutridas para evidenciar el nivel de daño al material genético, complementado con microscopía confocal y ensayo cometa.

Como todos los tejidos que tienen una tasa importante de renovación y proliferación celular, el hematopoyético requiere un gran suministro de nutrimentos (Borelli y cols. 2009). Se ha observado una disminución de la hematopoyesis, debido al estado nutricional subóptimo (Xavier y cols. 2007).

Se pueden presentar casos de anemia y leucopenia en individuos con DCP, lo cual manifiesta que el tejido hematopoyético se encuentra comprometido como resultado de la misma, derivando en la modificación del sistema inmunológico (Fock y cols. 2010).

Se ha observado que la DCP resulta en una reducción de leucocitos en sangre, especialmente linfocitos, debido tal vez a las anomalías en los órganos linfoides, lo que reduce su capacidad para producir dichas células. (Vituri y cols. 2001; Xavier y cols. 2007; Borelli y cols. 2009).

Los valores encontrados en el presente estudio, indican que el porcentaje de células linfocitos analizados por citometría de flujo que expresaron γ -H2AX es significativamente mayor en los grupos de ratas desnutridas de 2^o y 3^{er} grado en presencia y ausencia de H₂O₂. El aumento en el grupo DN2^o fue de 4 veces y de 2.9 veces para DN2^oH₂O₂; para el grupo DN3^{er} fue de 7.94 veces y el grupo de 3^{er} grado

en presencia de peróxido tuvo un incremento de 16.1 veces en comparación con el lote testigo. Los valores obtenidos por microscopía confocal indicaron un aumento significativo solo en el grupo DN3^{er}H₂O₂ comparado con el grupo BN de 27.3 veces; si bien los valores en todos los grupos desnutridos en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno se ven aumentados, el hecho de que la estadística no arroje diferencias es debido tal vez a que la n fue pequeña en la microscopía confocal.

En el caso de p53, los datos mostraron un incremento significativo de 1.25 veces en el grupo DN2^o y de 1.5 en BNH₂O₂; el caso contrario (mostrando un decremento significativo) se presentó en los grupos de ratas desnutridas de 3^{er} grado en presencia (2.9 veces) y ausencia de H₂O₂ (1.5 veces) con respecto al lote BN.

Para defender al organismo, el sistema inmunológico ejerce primero las funciones de defensa innata para posteriormente utilizar las adquiridas; lo anterior demanda la activación y dispersión del sistema inmunológico, así como la síntesis de una matriz de moléculas, por lo que el consumo de energía se eleva debido a que lo antepuesto requiere la duplicación de ADN, expresión de ARN, síntesis y secreción de proteínas (Schaible y cols. 2007).

Las cifras del presente estudio correspondientes a la expresión de γ -H2AX+ p53+, evidenciaron un aumento significativo en los grupos de ratas desnutridas de 2^o grado en presencia y ausencia de peróxido, así como en el grupo BNH₂O₂, el incremento fue de 2.36, 2.81 y 2.56 veces respectivamente en comparación con el lote testigo.

Reportes en la bibliografía indican que la ingesta deficiente de proteínas, predispone a la deficiencia de zinc. El vínculo existente entre la cantidad de proteínas

presente en los alimentos y la cantidad de este micronutriente es directo. La superóxido dismutasa (SOD, una de las principales enzimas que eliminan radicales libres) presente en el citoplasma de muchos tipos celulares y en el espacio extracelular, cuenta con un componente intrínseco: el zinc (Wapnir 2000).

El zinc es un micronutriente fundamental, ya que está involucrado en la síntesis de ADN y ARN, así como el funcionamiento adecuado de diversas enzimas. Su deficiencia, afecta diversos procesos que van desde la expresión génica, la síntesis proteica, hasta el desarrollo gonadal, apetito e inmunidad. Aunado a lo anterior, es significativo su papel en la función de las células que participan en la inmunidad no específica (neutrófilos y NK) y es elemental su presencia en procesos de inmunidad específica, tales como el equilibrio en las funciones de células T cooperadoras (Müller y cols. 2005; Liu y cols. 2014). Se ha reportado que también causa pérdidas considerables (40-70%) de precursores linfoides tipo B y T en médula ósea y timo, dado el estado nutricional bajo (Rey y cols. 2000). Se sabe que el zinc es un cofactor en diversas rutas de reparación del ADN, reportándose que la baja cantidad de éste, aumenta la ruptura de cadenas sencillas en el material genético (Song y cols. 2009).

Los datos obtenidos por citometría de flujo, microscopía confocal y ensayo cometa son consistentes; si bien la perspectiva de cada herramienta es diferente los resultados de cada una se relacionan. Por una parte, la proporción de células obtenida por electroforesis unicelular fue mayor en los grupos de ratas desnutridas de 3^{er} grado en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno. La citometría de flujo y la microscopía confocal muestran valores significativamente mayores de la histona

H2AX fosforilada en los grupos de ratas desnutridas de 2^o y 3^{er} grado con respecto al lote testigo. Si bien la maquinaria necesaria para el movimiento de H2AX sigue siendo poco clara (Vardabasso y cols. 2014), el presente trabajo externa la relación inversamente proporcional de los valores de γ -H2AX con p53. Lo anterior, indica que al situar a las células al estrés de la DCP, aunado al estrés del contacto con peróxido de hidrógeno, la célula disminuye su capacidad de responder a los agentes estresores.

Así mismo, el Mg^{+2} estabiliza la molécula de ADN (reduciendo el potencial estrés oxidante), promueve su duplicación y transcripción, mientras que niveles bajos de Mg pueden acelerar la senescencia celular mediante la reducción de la estabilidad del ADN, la síntesis de proteínas, y la función de las mitocondrias (Rowe 2012).

Sobre esta línea, el folato resulta importante en la dieta del organismo, debido a que diversas vías celulares dependen de él como fuente de carbono tales como metilación de proteínas, la síntesis de ADN y su mantenimiento. Una ingesta incorrecta de este, puede desembocar en mecanismos deteriorados de desarrollo y reparación del ADN en las neuronas (Lucock y cols. 2013). Por otro lado una ingesta elevada, puede afectar la síntesis de ADN, su metilación (determinante epigenético para la expresión de genes) y reparación (Lucock y cols. 2009). Se ha propuesto la hipótesis de que la exposición temprana al ácido fólico podría prevenir tumores al proveer de grupos metilo suficientes para mantener los patrones de metilación apropiados y la reparación del ADN (Crider y cols. 2011).

En diversos trabajos se ha observado que la insuficiencia de vitaminas E, D y C causa oxidación al material genético, daño cromosómico y rupturas de doble

cadena de ADN (Claycombe y cols. 2001; Chatterjee 2001; Halliwell 2001; Lee y cols. 2013).

Los datos expuestos en este trabajo revelan que la desnutrición provoca daño al ADN, lo que se ve reflejado en la detección de H2AX fosforilada. Además, se observó que al aumentar el grado de desnutrición existió mayor expresión de la histona γ -H2AX, mayor cantidad de células con daño alto (ensayo cometa) y niveles bajos de p53; lo anterior es de suma importancia, ya que existe evidencia que sugiere que el control de p53 del metabolismo celular y los niveles de especies reactivas de oxígeno, pueden ser críticos para la prevención del cáncer (Jiang y cols. 2013).

Se ha reportado que los organismos con DCP tienen los sistemas antioxidantes deteriorados, provocando acumulación de ERO, lo cual suscita daño al ADN. Ejemplo de ello, es cuando el H_2O_2 llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, produciendo $\cdot OH$, el cual, arremete contra el azúcar o la base correspondiente, dando como resultado lesiones en el material genético y alteraciones en las bases (Tuma 2001). Los cambios establecidos por ERO tienen un amplio espectro de daño: anomalías por oxidación, generando mutaciones y eliminación de fragmentos, pérdida de cromosomas y ruptura de cadenas en el ADN (Cooke y cols. 2003; Evans y cols. 2004).

Los grupos con H_2O_2 mostraron aumento en la expresión de H2AX, aumento leve de p53 y aumento considerable del número de nucleoides con migración clasificada como alta. En 2007, Tanaka y cols. reportaron que H_2O_2 induce γ -H2AX y

sospechan que los productos químicos que pueden generar ERO provocan la formación de H2AX fosforilada (Tanaka y cols. 2007).

Por otro lado, la acetilación de una o más lisinas en una proteína puede tener efectos funcionales mediante la alteración de su conformación y/o interacciones con otras proteínas. Esta modificación se identificó originalmente en las colas N-terminales de las histonas y se encontró que neutralizar su carga positiva, causando descondensación de la cromatina y marcado cambios en los patrones de expresión de genes. En 1997, Wei Gu y Robert Roeder descubrieron que la proteína p53 podía ser acetilada, siendo la primera proteína no histona que se sufre esta modificación (Gu y cols. 1997). Dicha proteína está controlada por varias y diversas modificaciones post-traduccionales; estas, pueden establecer la respuesta de p53 a diversas señales celulares y ayudar a determinar sus actividades fisiológicas (Reed y cols. 2015).

CONCLUSIONES

- En este estudio, los resultados muestran que la desnutrición calórico proteica está estrechamente relacionada con el daño al ADN.
- Los datos mostrados en el presente trabajo, evidencian incremento en el daño al material genético en linfocitos T derivados de ratas desnutridas, indicando susceptibilidad a presentar lesiones.
- Los grupos de ratas desnutridas de 2º y 3º grado en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno, muestran aumento en la expresión de γ -H2AX por citometría de flujo y microscopía confocal, así como del número de cometas clasificados con daño alto, comparados con el lote testigo.
- Las DSB pueden ser detectadas con alta sensibilidad evaluando la expresión de la histona γ -H2AX.
- Los grupos desnutridos en ambos niveles (moderada y grave) con y sin H₂O₂, muestran disminución en la expresión de p53 por citometría de flujo, señalando que la DCP afecta de manera similar la detección y respuesta al daño del material genético, agravándose en tercer grado.
- El presente trabajo muestra la relación existente entre p53, γ -H2AX y el rompimiento del ADN.
- Los resultados obtenidos sugieren que la desnutrición provoca rupturas de doble cadena en el ADN e induce una disminución considerable en la capacidad celular para repararlas.

CONSIDERACIONES

Si bien el presente estudio aporta información de las lesiones que genera la desnutrición en sus distintos niveles al ADN, debemos mirar que es sólo una parte del contexto en el que se desarrolla; muestra de ello son las figuras 12 y 13.

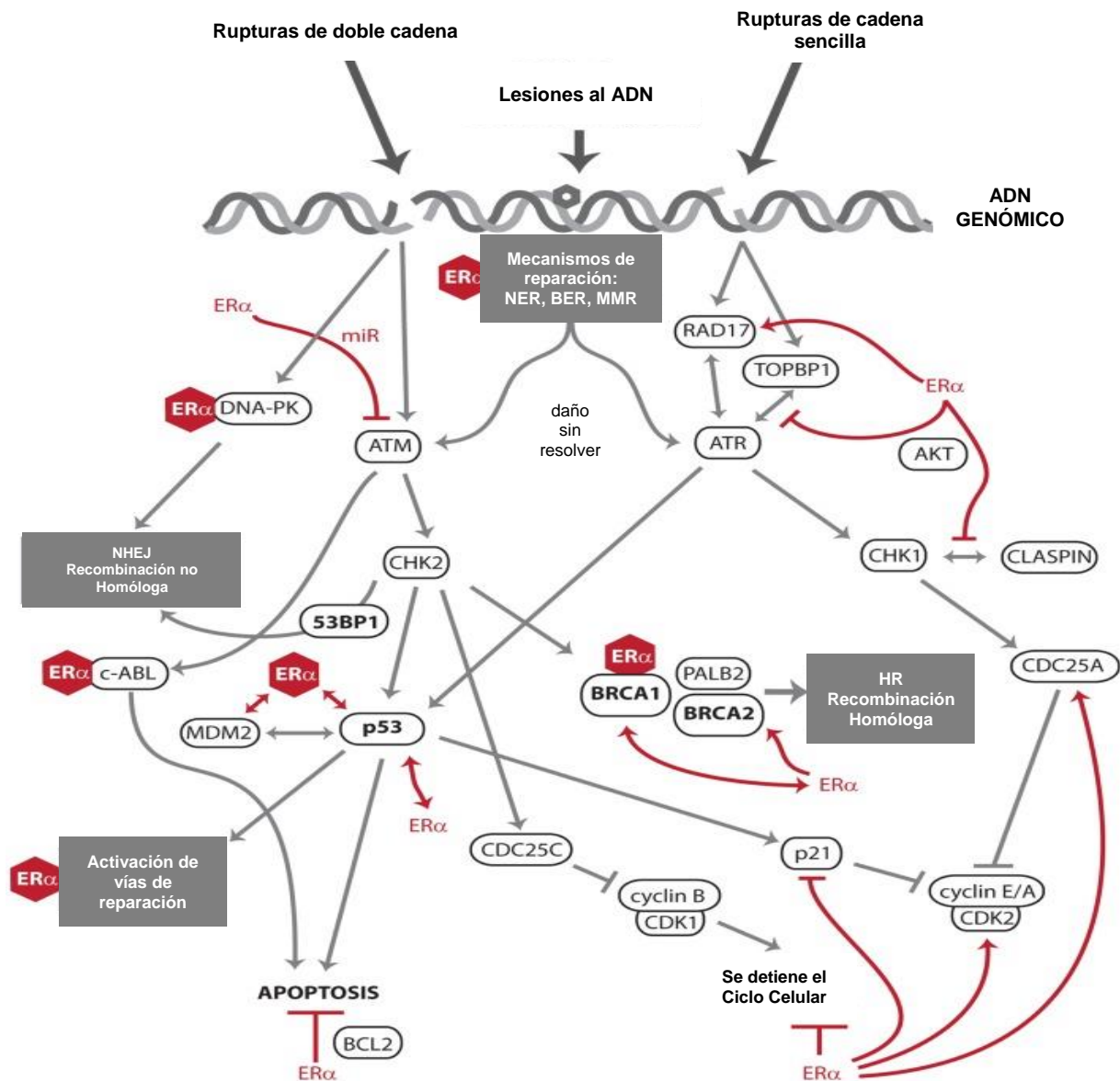


Figura 12. Efectores clave en la respuesta al daño al ADN.(Caldon 2014).

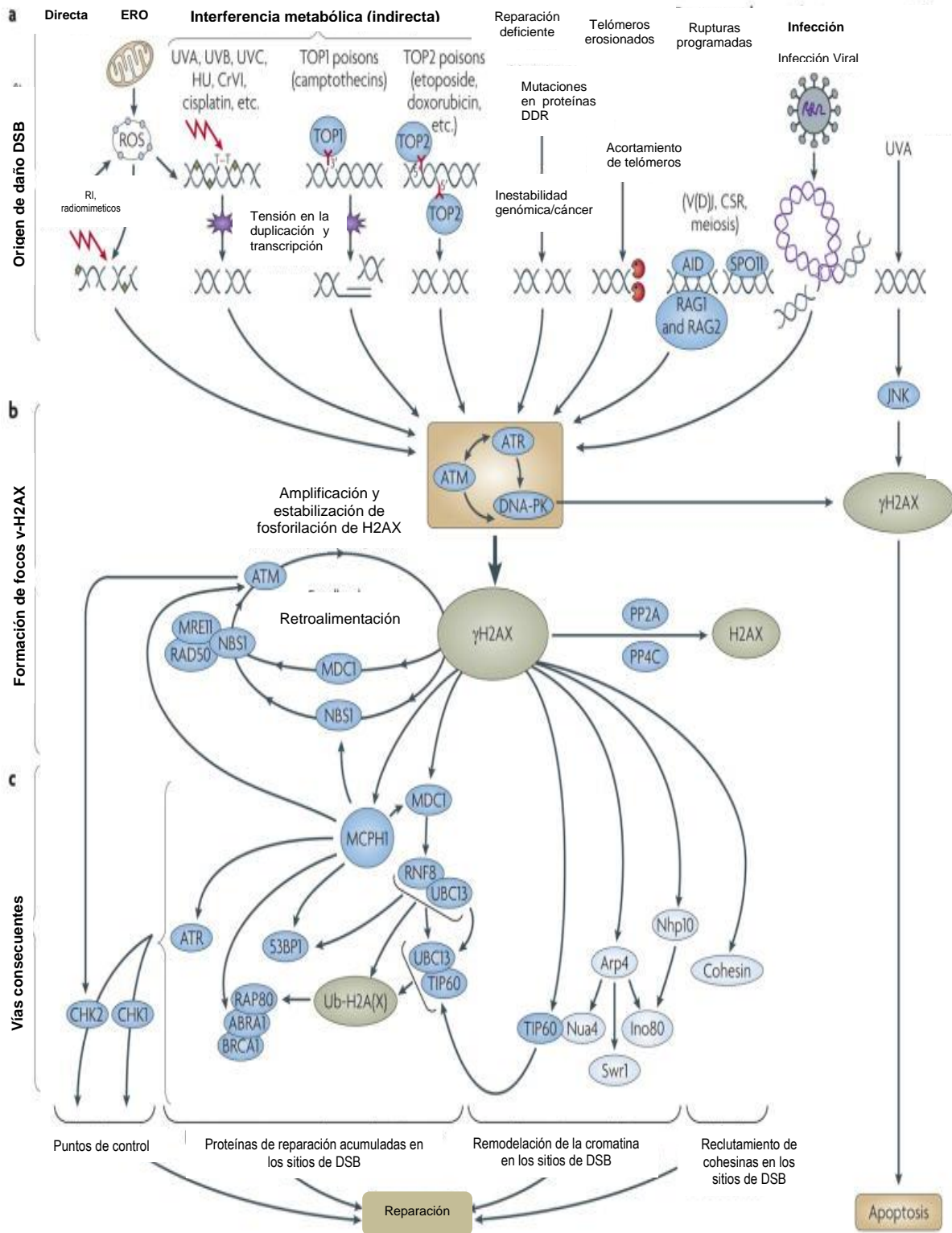


Figura 13. Vía de señalización de H2AX. (Bonner y cols. 2008).

PERSPECTIVAS

- Se requiere profundizar más en el tema para establecer de manera certera que es lo que está ocurriendo con cada uno de los grupos de estudio, por lo que es importante en estudios posteriores, aumentar el número de individuos estudiados.
- Teniendo en cuenta la diversidad y la interacción de las modificaciones posteriores a la traducción en las histonas, es una tarea difícil asignar efectos biológicos específicos de una sola modificación.
- Hay que tener en cuenta la totalidad de sucesos entre y dentro de las vías de señalización celular y las histonas.
- La correcta interpretación de la importancia de estas modificaciones también requiere un estudio detallado.

REFERENCIAS

- Abramsson-Zetterberg, L., G. Zetterberg, M. Berqvist, y cols. (2000). "Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes." Environ Mol Mutagen **36**: 22-31.
- Albertini, R. J., D. Anderson, G. R. Douglas, y cols. (2000). "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic ef
- . S. d. Lira, y cols. (2010). "Condicionamento físico aeróbico moderado promove redução no rápido ganho de peso de ratos adultos desnutridos nos períodos de gestação e lactação." Nutr **23**: 251-258.
- Ausió, J. y W. A. D. (2002). "The Many Tales of a Tail: Carboxyl-Terminal Tail Heterogeneity Specializes Histone H2A Variants for Defined Chromatin Function." Biochemistry **41**(19): 5945-5949.
- Banerjee, T. y D. Chakravarti (2011). "A Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation." Molecular and Cellular Biology **31**(24): 4858-4873.
- Bao, Y. (2011). "Chromatin response to DNA double-strand break damage." Epigenomics **3**: 307-321.
- Belyi, A. V. a. y A. J. Levine (2009). "One billion years of p53/p63/p73 evolution." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(42): 17609-17610.

- Betancourt, M., P. Balvanera y R. Ortiz (1986). "Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone-marrow cells of severely malnourished animals during early life." Mutation Research **175**: 29-31.
- Betancourt, M., R. Ortiz, C. González, y cols. (1995). "Effects of carcinogens in humans." Mutation Research **463**: 111-172.
- Araújo, T. N. d., L. V. C. d. Queiroz, K. D. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay." Mutation Research **331**: 65-77.
- Bing, L., M. Carey y J. L. Workman (2007). "The role of chromatin during transcription." Cell **128**: 707-719.
- Birke, L. (2003). "Who—or What—are the Rats (and Mice) in the Laboratory." Society & Animals **11**(3): 207-224.
- Bonner, W. M., C. E. Redon, J. S. Dickey, y cols. (2008). "γ-H2AX and cancer." Nature Reviews Cancer: 957-967.
- Borelli, P., F. Barros, K. Nakajima, y cols. (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.
- Caldon, E. C. (2014). "Estrogen Signaling and the DNA Damage Response in Hormone Dependent Breast Cancers." Frontiers in Oncology **4**(16).
- Castro, G. T. M. d. y J. A. García-Aranda (2005). "Nutriología Médica." Médica Panamericana **Desnutrición Energético-Proteínica**: 211-242.

- Cervantes-Ríos, E., R. O. Muñiz, A. L. Martínez-Hernández, y cols. (2012). "Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children." Mutation Research **731**: 68-74.
- Claycombe, K. J. y S. N. Meydani (2001). "Vitamin E and genome stability." Mutation Research **475**: 37-44.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu, y cols. (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology **17**(10): 1195-1214.
- Cortés, E. (1997). Detección de daño en el ADN por medio de electroforesis unicelular en células de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. Ciencias de la Salud. D.F., UAM-Iztapalapa. **Maestría**: 72.
- Cortés, E., C. González, M. Betancourt, y cols. (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**: 231-247.
- Crider, K. S., L. B. Bailey y R. J. Berry (2011). "Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions." Nutrients **3**(3): 370-384.
- Chatterjee, M. (2001). "Vitamin D and genomic stability." Mutation Research **475**: 69-88.
- Chen, X., J. Chen, S. Gan, y cols. (2013). "DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control." BMC Biology **11**(73).
- Chinen, J. y W. T. Shearer (2008). "6. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection." Journal of Allergy and Clinical Immunology **121**(2): S388-392.

- Chowdhury, D., M. C. Keogh, H. Ishii, y cols. (2005). "γ-H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair." Molecular Cell **20**(5): 801-809.
- Evans, M. D., M. Dizdaroglu y M. S. Cooke (2004). "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance." Mutation Research **567**(1): 1-61.
- Fenech, M. (2010). "Folate, DNA damage and the aging brain." Mech Ageing Dev. **131**: 236-241.
- Fock, R. A., M. M. Rogero, M. A. Viñolo Ramírez, y cols. (2010). "Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages." Inflammation **33**: 101-109.
- Garcia-Canton, C., A. Anadón y C. Meredith (2012). "γH2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: Applications for the assessment of the in vitro genotoxicity of cigarette smoke." Toxicology in Vitro **26**(7): 1075-1086.
- Gu, W. y R. G. Roeder (1997). "Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain." Cell **90**(4): 595-606.
- Gueri, M., J. M. Gurney y P. Jutsum (1980). "The Gomez classification. Time for a change?" Bulletin of the World Health Organization **58**: 773-777.
- Guerra, M. (2005). "Aportes tecnológicos en las intervenciones nutricionales poblacionales." Archivos Latinoamericanos de Nutrición. **18**:1. 1-10
- 18**(1): 1-10.
- Halliwell, B. (2000). "Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?" The American Journal of Clinical Nutrition **72**: 1082-1087.

- Halliwell, B. (2001). "Vitamin C and genomic stability." Mutation Research **475**: 29-35.
- Halliwell, B. (2006). "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life." Plant Physiology. **141**(2): 312-322.
- Halliwell, B. y M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" British Journal of Pharmacology **142**(2): 231-255.
- Hunt, C. R., D. Ramnarain, N. Horikoshi, y cols. (2013). "Histone Modifications and DNA Double-Strand Break Repair after Exposure to Ionizing Radiations." Radiat Res **179**(4): 383-392.
- Ibuki, Y. y T. Toyooka (2014). "Evaluation of chemical phototoxicity, focusing on phosphorylated histone H2AX." Journal of Radiation Research: 1-9.
- Inoue, M., E. Sato, M. Nishikawa, y cols. (2003). "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life." Current Medicinal Chemistry **10**(23): 2495-2505.
- INSP (2012). Encuesta Nacional de Nutrición. México.
- Ishihama, M., T. Toyooka y Y. Ibuki (2008). "Generation of phosphorylated histone H2AX by benzene metabolites." Toxicol In Vitro **22**(8): 1861-8.
- Ismail, I. H., T. I. Wadhra y O. Hammarsten (2007). "An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans." Nucleic Acids Research: 1-10.
- Jiang, D. y L. D. Attardi (2013). "Engaging the p53 metabolic brake drives senescence." Cell Research **23**: 739-740.

- Kamakaka, R. T. y S. Biggins (2005). "Histone variants: deviants? ." Genes & Development **19**: 295-310.
- Keogh, M. C., J.-A. Kim, M. Downey, y cols. (2006). "A phosphatase complex that dephosphorylates gamma-H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery." Nature **439**: 497-501.
- Krishna, G. y M. Hayashi (2000). "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation." Mutat Res: 155-166.
- Kruse, J.-P. y W. Gu (2009). "Modes of p53 Regulation." Cell **137**(4): 609-622.
- Lazare, S. S., E. E. Wojtowicz, L. V. Bystrykh, y cols. (2014). "microRNAs in hematopoiesis." Experimental Cell Research **329**(2): 234-238.
- Lee, J. Y., T.-Y. So y J. Thackray (2013). "A Review on Vitamin D Deficiency Treatment in Pediatric Patients." Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics **18**(4): 277-291.
- Li, S. (2012). "Implication of Posttranslational Histone Modifications in Nucleotide Excision Repair." International Journal of Molecular Sciences **13**(10): 12461-12486.
- Liu, J., A. Hanlon, C. Ma, y cols. (2014). "Low Blood Zinc, Iron, and Other Sociodemographic Factors Associated with Behavior Problems in Preschoolers." Nutrients **6**(2): 530-545.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, y cols. (2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health." Pharmacognosy Review **4**(8): 118-126.

- Lucock, M. y R. Leeming (2013). "Autism, seasonality and the environmental perturbation of epigenome related vitamin levels." Medical Hypotheses **80**(6): 750-755.
- Lucock, M. y Y. Zoe (2009). "Folic acid fortification: a double-edged sword." Clinical Nutrition and Metabolic Care **12**(6): 555-564.
- Lykke, M., A. Hother, C. Hansen, y cols. (2013). "Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition." Am J Transl Res **5**(5): 543-554.
- Macallan, D. (2005). "Malnutrition and infection." Medicine **33**(3): 14-16.
- Meek, D. W. y C. W. Anderson (2009). "Posttranslational Modification of p53: Cooperative Integrators of Function." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.
- Montilva, M., M. A. Ferrer, R. Nieto, y cols. (2003). "Uso del Método Necesidades Básicas Insatisfechas en la detección de comunidades con riesgos de desnutrición." Anales Venezolanos de Nutrición. **16**(1): 1-8.
- Müller, O. y M. Krawinkel (2005). "Malnutrition and health in developing countries." Canadian Medical Association Journal Articles. **173**(3): 279-286.
- Muñoz-Fontela, C., D. González, L. Marcos-Villar, y cols. (2011). "Acetylation is indispensable for p53 antiviral activity." Cell Cycle **10**(21): 3701-3705.
- Nájera, O., C. González, M. Betancourt, y cols. (2001a). "La desnutrición en México: revisión de los programas gubernamentales y los estudios diagnósticos de alcance nacional." Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. **58**: 120-133.

- Najera, O., C. Gonzalez, G. Toledo, y cols. (2004). "Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. ." Clin Diagn Lab Immunol. **11**(3): 577-580.
- Nemeth, M. J. y D. M. Bodine (2007). "Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways." Cell Research **17**: 746-758.
- Olmos, S., M. Reinoso, M. Márquez, y cols. (2001). "Cytogenetic studies in bonemarrowcells from Wistarrats in proteinmalnutrition." Metabolism **50**(9): 1025-1029.
- Ortiz, R., E. Cortés, L. Pérez, y cols. (1999). "Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica." Animal Experim: 33-39.
- Ortiz, R., L. Cortés, J. L. Gómez, y cols. (2000). "Análisis con citometría de flujo de los diferentes tipos de timocitos en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia." Ciencia en la frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ **1**: 77-84.
- Ortiz, R., L. Cortés, C. González, y cols. (1997). "Analysis of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children." Environ Mol Mutagen **30**: 363-370.
- Ortiz, R., L. Rodriguez, E. Cortés, y cols. (2006). Estudios sobre el material genético en desnutrición. Tópicos de Genética: 277-296.

- Parra-Gómez, L., J. R. Téllez-Girón y C. E. Briones (2003). "La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio." Facultad de Medicina, UNAM. **46**: 32-36.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, y cols. (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Current Biology **10**(15): 886-895.
- Pelletier, D. L. y E. A. Frongillo (2003). "Changes in Child Survival Are Strongly Associated with Changes in Malnutrition in Developing Countries." Journal of Nutrition **133**: 107-119.
- Petersen, R. C. (2013.). "Free-Radical Polymer Science Structural Cancer Model: A Review." Scientifica.
- R&D systems, a. b. b. (2004) "Genomic Instability Syndromes." **Volume**, DOI:
- Ray-Gallet, D., A. Gérard, S. Polo, y cols. (2005). "Variations sur le thème du "code histone" " M/S: Médecine Sciences **21**: 384-389.
- Redon, C. E., A. J. Nakamura, O. A. Martín, y cols. (2011). "Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker." Aging **3**(2).
- Redon, C. E., U. Weyemi, P. R. Parekh, y cols. (2012). " γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic." Biochim Biophys Acta **1819**(7): 743-56.
- Reed, S. M. y D. E. Quelle (2015). "p53 Acetylation: Regulation and Consequences." Cancers **7**(1): 30-69.

- Rey, L. y P. Fraker (2000). "Variations in the Cell Cycle Status of Lymphopoietic and Myelopoietic Cells Created by Zinc Deficiency." Journal of Infectious Diseases **182**(1): S16-S22.
- Rothkamm, K. y S. Horn (2009). "γ-H2AX as protein biomarker for radiation exposure." Ann Ist super sAnItà **45**(3): 265-271.
- Rowe, W. (2012). "Correcting magnesium deficiencies may prolong life." Clinical Interventions in Aging **7**: 51-54.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips y K. H. Vousden (2001). "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein." Current Opinion in Cell Biology **13**: 332-337.
- Saha, T., R. Kar K. y G. Sa (2014). "Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence." Progress in Biophysics and Molecular Biology.
- Sarma, K. y D. Reinverg (2005). "Histone variants meet their match." Nat Rev Mol Cell Biol **6**: 139-149.
- Schaible, U. E. y S. H. E. Kaufmann (2007). "Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts." PLos Med **4**(5).
- Sedelnikova, O., E. Rogakou, I. G. Panyutin, y cols. (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." Radiation Research **158**: 486-492.
- Sone, J., Piao Lianhua, Nakakido Makoto, y cols. (2014). "Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for γ-H2AX production and DNA repair." Nature Communications.

- Sone K., Piao Lianhua, Nakakido Makoto, y cols. (2014). "Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for γ -H2AX production and DNA repair." Nature Communications.
- Song, Y., S. W. Leonard, M. G. Traber, y cols. (2009). "Zinc Deficiency Affects DNA Damage, Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and DNA Repair in Rats." Journal of Nutrition **139**(9): 1626-1631.
- Tanaka, T., X. Huang, H. D. Halicka, y cols. (2007). "Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents." Cytometry A **71**(9): 648-61.
- Tang, Y., W. Zhao, Y. Chen, y cols. (2008). "Acetylation is indispensable for p53 activation." Cell **133**(4): 612-626.
- Tarry-Adkins, J., M. Martin-Gronert, D. Fernández-Twinn, y cols. (2013). "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." FASEB J **27**: 379-390.
- Toyooka, T. y Y. Ibuki (2009). "Cigarette sidestream smoke induces phosphorylated histone H2AX." Mutat Res **676**(1-2): 34-40.
- Toyooka, T., G. Ohnuki y Y. Ibuki (2008). "Solar-simulated light-exposed benzo[a]pyrene induces phosphorylation of histone H2AX." Mutat Res **650**(2): 132-9.
- Tuma, R. (2001). "The Two Faces of Oxygen." Science of Aging Knowledge Environment. **2001**(1): 1-5.

- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, y cols. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **39**(1): 44-84.
- Valko, M., C. Rodas, J. Moncol, y cols. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chemico-Biological Interactions **160**(1): 1-40.
- Vardabasso, C., Hasson Dan, Ratnakumar Kajan, y cols. (2014). "Histone variants: emerging players in cancer biology." Cellular and molecular life sciences **71**(3): 379-404.
- Vituri, C., M. Alvarez-Silva, A. Tretin, y cols. (2001). "Alteration of the bone marrow in extracellular matrix in mice undernourished. ." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **33**: 889-895.
- Vlijm, R., M. Lee, L. Jan, y cols. (2015). "Nucleosome Assembly Dynamics Involve Spontaneous Fluctuations in the Handedness of Tetrasomes." Cell **10**(2): 216-225.
- Wapnir, R. A. (2000). "Zinc Deficiency, Malnutrition and the Gastrointestinal Tract." Journal of Nutrition **130**(5): 1388S-1392S.
- Ward, I. y C. Junjie (2004). "Early Events in the DNA Damage Response." Current Topics in Developmental Biology **63**: 1-35.
- Xavier, J., M. Favero, M. Viñolo, y cols. (2007). "Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice." Histology and histopathology **22**(6): 651-660.

Xu Ye, P. D. B. (2011). "Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks." Cell Cycle **10**(2): 261-267.

Yang, A., N. Walker, R. Bronson, y cols. (2000). "p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours." Nature **404**: 99-103.

Zúñiga G., G. y. G. M., B. (2006). "The cytogenetic assay as a measure of genetic instability by genotoxic agents. ." An Sist Sanit Navar **19**(1): 127-150.