

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**“Detección de mutación somática *Pig-a* en eritrocitos de sangre
periférica 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

Mercedes Monserrat Pacheco Martínez

Comité Tutorial:

Director

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Asesores

Dra. Edith Cortés Barberena

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

México, D.F., a 28 de Septiembre de 2012

“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”.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada para estudios de Maestría con el número de registro: 248814.

Los miembros del jurado designados por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada **“Detección de mutación somática *Pig-a* en eritrocitos de sangre periférica de ratas desnutridas “**, el día 28 de Septiembre del año 2012.

PRESIDENTE

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

SECRETARIO

Dra. Carmen García Rodríguez

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Bioterio, Campo II
maricar_67@yahoo.com

VOCAL 1

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
leor@xanum.uam.mx

VOCAL 2

Dra. Silvia Patricia Pérez Vera

Laboratorio de Tejidos
Instituto Nacional de Pediatría
pperezvera@yahoo.com

JURADO

Presidente 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

Secretario Dra. Carmen García Rodríguez

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Bioterio, Campo II
maricar_67@yahoo.com

VOCAL 1 Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
leor@xanum.uam.mx

VOCAL 2 Dra. Silvia Patricia Pérez Vera

Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Instituto Nacional de Pediatría
pperezvera@yahoo.com

JURADO



Presidente 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



Secretario Dra. Carmen García Rodríguez
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Bioterio, Campo II
maricar_67@yahoo.com



VOCAL 1 Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
leor@xanum.uam.mx



VOCAL 2 Dra. Silvia Patricia Pérez Vera
Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Instituto Nacional de Pediatría
pperezvera@yahoo.com

COMITÉ TUTORAL

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

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. Leonor Rodríguez Cruz

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

leor@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo por haberme permitido trabajar con ustedes y por recibirme con gran entusiasmo

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Robert Heflich y Javed Bhalli por sus valiosos comentarios, apoyo y aportaciones para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortiz Muñiz, por confiar en mí y apoyarme en todo momento, por sus valiosos comentarios y observaciones, por enseñarme con su ejemplo y entereza, por darme ánimos en los momentos de incertidumbre, sin duda alguna usted es y seguirá siendo fuente de inspiración para mi formación profesional. Su confianza no será defraudada.

Dra. Leonor Rodríguez Cruz, le agradezco todo el apoyo, los consejos y sus acertados comentarios que me impulsaron día a día, por levantar mi ánimo en los momentos más difíciles, sobre todo...GRACIAS por la oportunidad que me brindó, nunca olvidaré su gesto de solidaridad.

Dra. Edith Cortés Barberena, gracias por apoyarme en el trabajo, por sus valiosos consejos y aportaciones, le agradezco los conocimientos que me ha transmitido, no dude en que los emplearé de la mejor manera.

Dra. Carmen García Rodríguez, le agradezco sus apreciables comentarios y asesorías, sin ellos este trabajo no hubiese llegado a su culminación, gracias por el tiempo que me ha brindado y por creer en éste proyecto.

A la Dra. Patricia Pérez Vera por realizar valiosos comentarios y por su gran apoyo en la realización de esta tesis.

GRACIAS

A la familia Pacheco Martínez, por su apoyo constante e incondicional, por entender mi mundo y por siempre creer en mí.

A mi madre la señora María Isabel Martínez Rivera, por su infinito amor, paciencia y apoyo. A mi padre el señor Roberto Pacheco Valencia, porque los años nos han unido y de alguna forma hemos recuperado el tiempo perdido, gracias por los ánimos y los consejos, por acompañarme en los momentos de desesperación, señores, le dedico esta tesis...

A mis hermanos Edgar y Roberto por quererme tanto y hacerme reír, gracias porque a pesar de las tempestades nos hemos mantenido siempre con optimismo.

A todos mis amigos, por los buenos y malos momentos, por brindarme su amistad y mantenerla por años, por preocuparse por mí, muchas gracias los quiero mucho, y para no romper con los estilos, vamos por orden alfabético, Angy, Elsa, Jessi, Lázaro, Nancy, Omar Nápoles, Rayn, Soni, Vladimir y Vero. Porque amigos como ustedes es un lujo tenerlos.

Gracias Dra. Elsa Cervantes Ríos por tu amistad sincera, por las risas y las caras tristes, por acompañarme y brindarme valiosos consejos, te quiero amiga.

A Miguel porque acompañarme en ésta odisea no te ha resultado cosa fácil, te agradezco porque has mantenido el ánimo a pesar de mis días malos, por tenerme paciencia y por tu apoyo en todo momento.

Por último, nuevamente gracias a todas las personas que de alguna forma han contribuido a forjar mi profesión y que no me facilitaron las cosas, sin ustedes, no sería posible ser...

Monserrat

RESUMEN

La asimilación deficiente de alimentos por el organismo conduce a un estado patológico con distintos grados y manifestaciones clínicas, conocido como Desnutrición (Gómez, 1946).

Los estudios en el área de la toxicología genética han generado un número importante de procedimientos *in vivo* e *in vitro*, los cuales han sido diseñados para monitorear los efectos que diversos agentes físicos y químicos tienen sobre la integridad genética de las células, así como los posibles riesgos que estos representan para los organismos (Abramsson y cols., 2000; Krishna y Hayashi, 2000). Entre estos procedimientos se incluyen: la medición de proteínas asociadas al ADN, localización de mutaciones puntuales o eventos genéticos que afectan a un gen específico (Abramsson y cols., 2000).

El gen glucosilfosfatidilinositol de clase A (*Pig-a*) se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Takahaski y cols., 1993; Rosee, 1997; Tomita, 1999; Phonethepswath y cols., 2008). Este gen codifica para la subunidad catalítica que participa en la primera etapa de la síntesis de de glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Takahaski y cols., 1993; Hernández y cols., 2008). GPI es esencial para el anclaje de una gran variedad de proteínas de la membrana citoplasmática (Hernández y cols., 2008).

En los últimos años ha surgido un nuevo ensayo *in vivo* de detección de mutación somática basado en el gen *Pig-a* (*Pig-a* en los roedores, *PIG-A* en los seres humanos). El ensayo consiste en detectar mutaciones somáticas por medio de citometría de flujo. En una célula normal un número de proteínas sintetizadas en el

retículo endoplásmico llegan a unirse covalentemente a la molécula de GPI. Estas proteínas dependientes de GPI aparecen en la superficie celular, y pueden ser detectadas por los anticuerpos apropiados conjugados con fluorocromos (Karadimitris y Luzzatto, 2001).

En este estudio se utilizó el ensayo *Pig-a* como una herramienta para analizar el daño génico en un modelo de desnutrición grave expuesto a un potente mutágeno. El ensayo se basó en realizar un marcaje diferencial de reticulocitos y eritrocitos usando un anticuerpo conjugado con un fluorocromo (antiCD59-PE). Se tomó como indicador de daño al material genético de las células, el incremento en las frecuencias de mutantes *Pig-a*, que fueron analizadas en un millón de células, procedentes de sangre periférica de ratas cepa Wistar expuestas a un mutágeno durante 8 semanas.

Los resultados muestran que la desnutrición grave por sí misma tiene un efecto dañino sobre la integridad del material genético. Las frecuencias de mutantes se incrementaron en el tiempo. El ensayo *Pig-a* es de reciente introducción como método génico de evaluación genotóxica. De acuerdo a los resultados obtenidos, es necesario continuar el estudio del efecto de la desnutrición sobre el material genético, apoyándose en estudios complementarios.

ABSTRAC

The deficient assimilation of nutrients by the body leads to a pathological condition with varying degrees and manifestations, known as malnutrition (Gomez, 1946). Studies in the area of genetic toxicology have generated a large number of procedures in vivo and in vitro, which are designed to monitor the effects of various physical and chemical agents have on the genetic integrity of cells and the possible risks they pose for the organisms (Abramsson et al., 2000, Krishna and Hayashi, 2000). These procedures include measurement of DNA-associated proteins, location of mutations or genetic events affecting a specific gene (Abramsson et al., 2000).

The gene glycosylphosphatidylinositol of class A (*Pig-a*) is located on the short arm of chromosome X (Takahaski et al., 1993; Rosee, 1997; Tomita, 1999; Phonethepswath et al., 2008). This gene encodes the catalytic subunit involved in the first stage of the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Takahaski et al., 1993, Hernandez et al., 2008). GPI anchor is essential for a variety of cytoplasmic membrane proteins (Hernandez et al., 2008).

In recent years a new in vivo assay for detection of somatic mutation in the gene based *Pig-a* (*Pig-a* in rodents, *PIG-A* in humans). The assay involves the detection of somatic mutations by flow cytometry. In a normal cell a number of proteins synthesized in the endoplasmic reticulum become covalently bound to the GPI molecule. These proteins appear GPI dependent on the cell surface and can be

detected by appropriate antibodies conjugated with fluorochromes (Karadimitris and Luzzatto, 2001).

In this study we used the *Pig-a* test as a tool for analyzing gene damage in a model of severe malnutrition exposed to a potent mutagen. The assay was based on post a differential staining of reticulocytes and erythrocytes using a fluorochrome-conjugated antibody (antiCD59-PE). Was taken as an indicator of damage to the genetic material of cells, increases in mutant frequencies *Pig-a*, which were analyzed in a million cells from peripheral blood of rats Wistar exposed to a mutagen for 8 weeks.

The results show that severe malnutrition alone has a harmful effect on the integrity of genetic material. The frequencies of mutants increased over time. The trial *Pig-a* is newly introduced as a method of evaluating genotoxic gene. According to the results obtained, it is necessary to continue the study of the effect of malnutrition on the genetic material, based on studies.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	
1. Introducción	1
1.1 Desnutrición	2
1.1.1 Clasificación de la desnutrición	3
1.1.2 Tipos de desnutrición grave	3
1.2 Modelos experimentales para la inducción de la desnutrición	4
1.3 Estudios de DCP y daño citogenético	6
1.4 Estudios de DCP a nivel génico	8
1.5 Gen glucosilfosfatidilinositol de clase A (<i>Pig-a</i>)	10
1.6 Proteínas dependientes de GPI	11
1.6.1 Protectina (CD59)	12
1.7. Ensayo <i>Pig-a</i>	13
1.7.1 Principio del ensayo <i>Pig-a</i>	14
1.8. Mutágenos y Mutagénesis	16
1.9 Eritropoyesis	19
2. Pregunta de investigación	21
3. Justificación	21
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	22

6. Método	23
6.1 Inducción de la desnutrición durante la lactancia	23
6.1.1 Estandarización del modelo de inducción de desnutrición	24
6.2 Tratamiento con ENU	24
6.3 Toma de muestra de sangre periférica	25
6.3.1 Detección de la mutación <i>Pig-a</i> (Marcaje de la muestra)	25
6.3.2 Muestra de calibración (“Muestra Pseudomutante”)	26
6.3.3 Análisis por citometría de Flujo	27
6.4 Selección del análisis de las muestras por citometría de Flujo	27
6.5 Análisis estadístico de los resultados	29
7. Resultados	29
7.1 Peso de las ratas	29
7.2 Frecuencia de Reticulocitos mutantes (Ret-Mut)	32
7.2.1 Frecuencias basales de Ret-Mut (antes del tratamiento)	34
7.2.2 Frecuencias de Ret-Mut en la semana 2 después del tratamiento	35
7.2.3 Frecuencias de Ret-Mut en la semana 3 después del tratamiento	36
7.2.4 Frecuencias de Ret-Mut en la semana 7 después del tratamiento	38
7.3 Frecuencia de Eritrocitos mutantes (Eri-Mut)	40
7.3.1 Frecuencias basales de E-Mut (antes del tratamiento)	42
7.3.2 Frecuencias de E-Mut en la semana 1 después del tratamiento	43

7.3.3 Frecuencias de E-Mut en la semana 2 después del tratamiento	44
7.3.4 Frecuencias de E-Mut en la semana 7 después del tratamiento	46
8. Discusión	49
8.1 Modelo de inducción de la desnutrición	49
8.2 Ensayo <i>Pig-a</i>	50
8.3 Frecuencia de Reticulocitos mutantes (Ret-Mut)	51
8.4 Frecuencia de Eritrocitos mutantes (Eri-Mut)	53
8.5 Susceptibilidad a daño genético en desnutrición	55
9. Ensayos de mutación génica en estudios de desnutrición	57
10. Conclusiones	59
11. Perspectivas	60
12. Referencias	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Del gen <i>Pig-a</i> en el cromosoma X	10
Figura 2. Célula normal y célula mutante <i>Pig-a</i>	15
Figura 3. Eritropoyesis normal y formación de mutantes <i>Pig-a</i> en sangre periférica de rata	20
Figura 4. Estrategia de análisis	28
Figura 5. Muestra de calibración	28

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Peso de las ratas	30
Gráfica 2. Frecuencias individuales de Ret-Mu a los 14 días de edad	34
Gráfica 3. Frecuencias individuales de Ret-Mu en la semana 2 después del tratamiento	35
Gráfica 4. Frecuencias individuales de Ret-Mu en la semana 3 después del tratamiento	37
Gráfica 5. Frecuencias individuales de Ret-Mu en la semana 7 después del tratamiento	38
Gráfica 6. Cinética de Ret-Mut en las 7 semanas de muestreo	39
Gráfica 7. Frecuencias individuales de E-Mu a los 14 días de edad	42
Gráfica 8. Frecuencias individuales de E-Mu en la semana 1 después del tratamiento	43
Gráfica 9. Frecuencias individuales de E-Mu en la semana 2 después del tratamiento	45
Gráfica 10. Frecuencias individuales de E-Mu en la semana 7 después del tratamiento	46
Gráfica 11. Cinética de E-Mut en las 7 semanas de muestreo	47

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro I. Productos del ADN después de la exposición a ENU	17
Cuadro II. Peso (gramos) de las ratas Bien Nutridas y Desnutridas	31
Cuadro III. Número de Ret-Mut por millón de células analizadas	33
Cuadro IV. Número de Eri-Mut por millón de células analizadas	41
Cuadro V. Diferencias significativas de las frecuencias de mutantes de los grupos BN contra DN con $p \leq 0.05$	48
Cuadro VI. Fortalezas y debilidades del ensayo <i>Pig-a</i> vs HPRT	58

ABREVIATURAS

AC	Aberraciones Cromosómicas
ADN	ácido Desoxirribonucleico
ARN	ácido Ribonucleico
BN	Ratas Bien Nutridas
DCP	Desnutrición calórico-proteínica
DES	Desnutrición
DN	Ratas Desnutridas
ENU	N-etil-N-nitroso urea
E	Eritrocitos
E-Mut	Eritrocitos Mutantes
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
HPN	Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
MN	Micronúcleos
PBS	Buffer de fosfatos
PE	Ficoeritrina
<i>Pig-a</i>	Gen glucosilfosfatidilinositol de clase A en roedores
<i>PIG-A</i>	Gen glucosilfosfatidilinositol de clase A en humanos
Ret	Reticulocitos
Ret-Mut	Reticulocitos Mutantes

1. Introducción

Durante la infancia ocurren cambios importantes en el crecimiento y desarrollo humano. Durante ésta, se logra el niño logra la madurez inmunológica, se adquieren habilidades y destrezas en el desarrollo psicomotor, por lo que es un periodo importante para la formación del individuo. La nutrición ocupa un lugar central al proporcionar la energía y los sustentos necesarios para las exigencias del crecimiento y propiciar las condiciones adecuadas para un desarrollo óptimo (Romero, 2005).

La asimilación deficiente de alimentos por el organismo puede conducir a un estado patológico conocido como DES, con distintos grados y manifestaciones. Este término simplificó extraordinariamente la confusión y variedad de nombres que existían en las distintas escuelas de pediatría y que se usaban para denominar padecimientos semejantes: las entidades clínicas llamadas hipotrepisia, hipotrofia, distrofia, atrepisia, atrofia de Parrott, descomposición, consunción, malnutrición y otras más, son distintas manifestaciones de un mismo padecimiento de etiología variada (Gómez, 1946).

Los estudios sobre DES en humanos son indispensables, sin embargo, para el entendimiento de los efectos de la DES en órganos o tejidos diferentes a una muestra de sangre, no son factibles. Por este motivo, se proponen modelos de estudio en animales desnutridos experimentalmente ya que, de esta manera se controlan diversas variables que se puedan presentar en los niños debido a que la viene acompañada de otros padecimientos, principalmente infecciones (Ortiz, 1987).

Los estudios citogenéticos sobre los efectos de la DES en modelos de experimentación, brindan información básica que permite obtener un mejor entendimiento acerca de este padecimiento. Dentro de ellos se encuentran los de nivel génico que se basan en establecer si existe una relación entre la DES y la frecuencia de mutaciones en un organismo.

1.1 Desnutrición

La deficiencia de macronutrientes como las proteínas, carbohidratos y grasa, provoca desnutrición calórico-proteínica (DCP) y combinada con la deficiencia de micronutrientes, representa uno de los principales problemas nutricionales que afecta a millones de mujeres embarazadas, ancianos y niños (Rodríguez y cols., 2011).

Este padecimiento daña las funciones celulares de manera progresiva, afectándose el depósito de nutrientes, el crecimiento, la capacidad de respuesta al estrés, el metabolismo energético, los mecanismos de comunicación y de regulación celular, por lo que, de no controlarse a tiempo, puede provocar la muerte del organismo que la padece (Calzada, 1998).

Diversos estudios han demostrado que la DES aumenta el riesgo de infecciones y muerte (Pelletier y cols., 1993). Las causas más frecuentes de muerte en niños menores de 5 años son diarrea aguda e infección respiratoria aguda. Varios estudios han demostrado que la DES está frecuentemente asociada causalmente con estas muertes. Sin embargo, rara vez aparece como causa de muerte en los certificados de defunción, por lo que su impacto es en gran medida subestimado (Rodríguez y cols., 2011).

1.1.1 Clasificación de la desnutrición

Gómez en 1946 hizo una descripción de este padecimiento y lo clasificó en tres grados:

DES de primer grado o leve: cuando el déficit de peso se encuentra entre el 10% y 24%.

DES de segundo grado o moderada: el déficit de peso es mayor de 25% y menor de 39%.

DES de tercer grado o grave: cuando existe un déficit de peso mayor al 40%. En este grado, el organismo ha agotado casi todas las reservas para su sobrevivencia.

Esta clasificación se basa en diferentes indicadores, dentro de los que se considera principalmente el déficit de peso, de talla y la relación peso/talla con respecto a lo esperado para la edad cronológica del organismo (Cravioto y Vega-Franco, 1995; Ortiz y cols., 1999).

1.1.2 Tipos de desnutrición grave

La DES grave a su vez, tiene dos manifestaciones clínicas: el marasmo y el kwashiorkor (Gómez, 1946; Golden, 2002). El marasmo se presenta en niños menores de un año de edad y es producto de una dieta pobre en proteínas y calorías; se caracteriza por un importante retraso del crecimiento.

El niño con marasmo presenta cuadros de infecciones, diarreas, pérdida de grasa corporal, inflamación estomacal, ojos hundidos, pérdida de peso, cambios en el color del cabello y una apariencia física de inanición severa (Parra y cols., 2003).

Por otro lado, kwashiorkor es un término aplicado a un niño cuya ingesta de carbohidratos es variable pero no tiene proteínas en su dieta, generalmente se registra en niños de 1 a 5 años de edad (Behrman y cols., 1986; Frenk, 1989; Golden, 2002). Se caracteriza por edema en abdomen y extremidades (Sauerwein y cols., 1997; Krawinkel, 2003) además de la presencia de otros síntomas como son: cambio en el color del cabello el cual cae con facilidad al tocarlo, piel deshidratada y descamación. (Sauerwein y cols., 1997; Vega, 1999).

En los países en desarrollo, aproximadamente el 3.5% de los niños menores de 5 años de edad, sufren DES grave. Aunque los tipos leves y moderados de DES infantil son aún más frecuentes, su importancia en la morbilidad y mortalidad infantil es menos reconocida (Ahmed y cols., 2009). La magnitud del problema de la DES varía de un país a otro y en las diferentes áreas geográficas de un mismo país. En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006, refiere que 472 890 (5 %) niños menores de cinco años tuvieron peso bajo; 1194 805 (12.7 %), talla baja y alrededor de 153 000 (1.6 %), presentaban marasmo (Olaiz-Fernández y cols., 2006).

1.2 Modelos experimentales para la inducción de desnutrición

Desde hace algunas décadas, se ha mostrado interés por estudiar los efectos causados por la DES y las posibles secuelas en la salud y desarrollo posterior del organismo (Chandra, 1996; Ortiz y cols., 2006).

Los estudios sobre DES en humanos son indispensables, sin embargo, para entender sus efectos en diferentes órganos, este tipo de estudios no son factibles. Por lo anterior, es necesario proponer y realizar estudios en modelos con organismos desnutridos experimentalmente, ya que de esta manera es posible controlar diversas variables (Cortés, 1997).

Dentro de los estudios realizados sobre DES, los modelos animales han sido ampliamente utilizados desarrollándose principalmente en rata y ratón (Ortiz y cols., 1999). Si bien los estudios del efecto de la DES en diferentes etapas de la vida son relevantes, los estudios durante la lactancia podrían considerarse prioritarios, dada la importancia de este período, el cual, en la rata corresponde a la infancia temprana de los niños (Medina, 2005).

Básicamente dos métodos son utilizados para inducir DES en animales de laboratorio durante la lactancia (Ortiz y cols., 1996): uno de ellos está basado en la deficiente calidad del alimento ingerido, en éste, las crías son alimentadas por una nodriza desnutrida que produce leche de calidad deficiente (Resnick y cols., 1982; Marin y cols., 1995).

El otro método, implica la disminución de la cantidad de la leche disponible para cada cría al establecerse la competencia por el alimento, el método consiste en incrementar el número de crías por nodriza, lo que tiene como consecuencia que la cantidad de alimento que puede ingerir cada una de ellas sea baja (Benedetti y cols., 1992; Ortiz y cols., 1996).

Los estudios sobre DES, particularmente realizados en rata, han aportado información valiosa con relación a las posibles secuelas producidas por la DES en diversos niveles y en diferentes etapas de la vida.

Además, los estudios en modelos animales presentan diversas ventajas, como son: mayor control de variables, la posibilidad de realizar estudios *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, además de permitir utilizar diversos órganos, tejidos y tipos celulares, así como poder determinar la susceptibilidad y el posibles efecto sobre la funcionalidad celular (Ortiz y cols., 1996).

1.3 Estudios de DCP y daño citogenético

En 1971, en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, se inició un programa de investigación con el objetivo de estudiar los efectos producidos por la DCP en los niveles citogenético y celular (Betancourt y Ortiz, 1991). Para obtener información básica sobre los efectos de la DCP se han empleado diversos ensayos, técnicas y herramientas. En particular, este grupo de investigación ha realizado estudios con métodos citogenéticos, como son: aberraciones cromosómicas (AC), electroforesis unicelular, también denominado ensayo cometa, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y el ensayo de micronúcleos (MN).

En 1971, Armendares y cols., observaron un incremento en la frecuencia de AC en linfocitos de niños con DCP, por el contrario Betancourt (1979) no encontró diferencia entre su grupo experimental y el testigo. A pesar de la variabilidad mostrada entre estos estudios, se puede afirmar que existe una tendencia de los organismos desnutridos a presentar mayor frecuencia de AC que los organismos bien nutridos (Betancourt y Ortiz, 1991).

En 1979 Mutchinick y cols., realizaron estudios con cultivos de linfocitos de niños con DES grave donde no encontraron aumento en la frecuencia promedio de ICH, mientras que otros trabajos sí mostraron aumento en el promedio al analizar este parámetro en los niños con DES de tercer grado (Murthy y cols., 1980; Ortiz y cols., 1994).

Un estudio con células de médula ósea de ratones adultos desnutridos, demostró diferencias significativas en la frecuencia de ICH entre el grupo experimental y testigo (Murthy y Srikantia, 1981), asimismo en 1986 Betancourt y cols., observaron incremento en esta frecuencia en ratas desnutridas durante la lactancia.

El análisis de ICH ha revelado resultados controversiales, se ha reportado que la frecuencia de ICH era similar en niños bien nutridos y desnutridos, mientras que otros autores han reportado una alta frecuencia de ICH en niños desnutridos (Murthy y Rahiman, 1994 y Ortiz y cols., 1994).

Cortés y cols., (2001) detectaron daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) por medio de electroforesis unicelular, de diferentes tipos celulares (bazo, sangre periférica y médula ósea) de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, observaron que la DES está asociada con el incremento de daño al ADN en los tipos celulares estudiados.

Ortiz y cols. (1997) encontraron que la frecuencia de MN en linfocitos de niños con DCP era mayor comparada con la de los niños bien nutridos.

De igual forma, por medio del ensayo cometa se ha detectado que la DES causa daño al ADN, aunque este daño también se ha asociado con la presencia de infecciones y tratamientos farmacológicos al que se somete a los niños que presentan estas patologías (Betancourt y cols., 1995).

Ortiz y cols., (2004) evaluaron la frecuencia de MN en reticulocitos (Ret) de sangre periférica de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, observaron que la frecuencia de MN es mayor en las células de ratas desnutridas en relación a la observada en las células de ratas bien nutridas. Estos estudios indican que la DCP produce daño celular *in vivo* y este daño puede producir efectos negativos para el desarrollo del organismo.

1.4 Estudios de DCP a nivel génico

Las mutaciones cromosómicas son las más estudiadas y algunas de ellas ya han sido observadas en la DCP, sin embargo, no se sabe cómo la DES afecta o influye en la frecuencia de mutaciones génicas.

Como se mencionó previamente, dentro de los estudios citogenéticos reportados por Betancourt y Ortiz en (1991) acerca de AC e ICH en organismos desnutridos, se observó que la DES provoca daño al ADN. Sin embargo, dentro de los estudios génicos, no se ha reportado si se presenta una alteración en las frecuencias de mutación de un gen en organismos desnutridos y bien nutridos.

El gen de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) fue estudiado en ratas con DCP, no se encontró un resultado positivo con respecto a la frecuencia de mutantes, debido a que no se presentaron diferencias significativas entre las frecuencias del grupo de ratas desnutridas en comparación con el grupo testigo (Cortés, 1993). El gen HPRT ha sido el único gen con el que se ha ensayado.

Los estudios en el área de la toxicología genética han generado un número importante de procedimientos *in vivo* e *in vitro*, los cuales han sido diseñados para monitorear los efectos que diversos agentes físicos y químicos tienen sobre la integridad genética de las células, así como los posibles riesgos que estos representan para los organismos (Abramsson y cols., 2000; Krishna y Hayashi, 2000). Entre estos procedimientos se incluyen: la medición de proteínas asociadas al ADN, localización de mutaciones puntuales o eventos genéticos que afectan a un gen específico, ensayos para detectar ICH, detección de AC, ensayo de MN y detección de mutaciones en mini satélites (Abramsson y cols., 2000).

Las mutaciones somáticas se pueden detectar utilizando genes centinelas; el gen glucosilfosfatidilinositol de clase A (*Pig-a*) es uno de esos genes (Hernández y cols., 2008; Peruzzi y cols., 2010).

1.5 Gen glucosilfosfatidilinositol de clase A (*Pig-a*)

El gen *Pig-a* se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Takahaski y cols., 1993; Rosee, 1997; Tomita, 1999; Phonethepswath y cols., 2008). Este gen codifica para la subunidad catalítica del complejo N-acetilglucosamina transferasa que participa en la primera etapa de la síntesis de de glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Takahaski y cols., 1993; Hernández y cols., 2008).

La molécula de GPI es esencial para el anclaje de una gran variedad de proteínas de la membrana citoplasmática; tiene una estructura altamente conservada a lo largo de la evolución. Consta de una molécula de fosfatidilinositol, un núcleo glucano formado por una molécula de N-glucosamina y 3 manosas, y una molécula de fosfoetanolamina (Hernández y cols., 2008).

Las proteínas ancladas a través de GPI a la membrana citoplasmática tienen un papel importante en diferentes funciones celulares, prueba de ello es que una síntesis deficiente de GPI en el ratón, resulta letal durante el desarrollo embrionario. El hecho de que el núcleo estructural de esta molécula se haya conservado a lo largo de la evolución, evidencia también su importancia biológica. En este sentido, hoy se reconoce que la función fundamental del anclaje GPI consiste en permitir una asociación estable entre las proteínas y la membrana celular (Phonethepswath y cols., 2008).

1.6 Proteínas dependientes de GPI

Las proteínas dependientes de GPI, no tienen una distribución uniforme en la membrana citoplásmica, sino que se sitúan en microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol denominadas “balsas” y el anclaje GPI confiere a las proteínas asociadas a él una elevada movilidad lateral sobre la superficie celular. En términos generales, hoy se sabe que las “balsas”, donde están implicadas en procesos de señalización celular, circulación de proteínas intracelulares y endocitosis independiente de clatrina (Hernández y cols., 2008).

A pesar de no disponer de dominios intracelulares o de dominios transmembranales, las proteínas dependientes de GPI son capaces de inducir señales intracelulares en las que intervienen segundos mensajeros en el citoplasma, los cuales pueden inducir la activación e incluso la proliferación de células hematopoyéticas (Rosti, 2000).

Hasta la fecha se han identificado numerosas proteínas de membrana que se anclan a la superficie de células hematopoyéticas a través de GPI. La síntesis de GPI es un proceso complejo en el que intervienen numerosos genes, sin embargo no se han identificado mutaciones en ningún gen diferente del *Pig-a*; esto se debe a que los demás genes implicados en la ruta de biosíntesis de GPI se localizan en cromosomas autosómicos y se necesita que la mutación se presente en ambos alelos, este evento es poco probable y raro (Hernández y cols., 2008; Rosti, 2000).

La protectina también conocida como CD59 es una proteína dependiente de GPI y ha sido ampliamente usada en el ensayo *Pig-a*.

1.6.1 Protectina (CD59)

La proteína CD59 también es llamada MIRL (inhibidor de la lisis reactiva de membrana) o protectina, es una proteína de 18kD que inhibe la formación del complejo de proteínas del sistema del complemento C5b-9 de ataque a la membrana (Sugita y cols., 1989).

Ante la falta de expresión de CD59 en la superficie de la célula, C5b se une a alrededor de 16 moléculas de C9 para constituir el complejo de ataque a la membrana. Como consecuencia de este evento, se forman poros en la membrana, lo cual, a su vez, favorece la entrada de fluidos extracelulares. Estos eventos desembocan en la muerte de la célula (Ninomiya y Sims 1992).

CD59 se expresa en todos los subtipos de leucocitos, además de plaquetas y eritrocitos (E) (Hernández y cols., 2008).

1.7 Ensayo *Pig-a*

En los últimos años ha surgido un nuevo ensayo *in vivo* de detección de mutación somática basado en el gen *Pig-a* (*Pig-a* en los roedores, *PIG-A* en los seres humanos).

Miyata y cols., (1993) estudiaron la enfermedad conocida como Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), y encontraron que esta enfermedad estaba asociada con mutaciones somáticas del gen *PIG-A* (Bessler y cols., 1994). De igual modo determinaron que las células madre hematopoyéticas mutantes podrían experimentar una expansión clonal, y que esto, requería de un mecanismo de selección específica (Luzzatto y cols., 1997).

Estas ideas llevaron a la formulación de la hipótesis de que las células portadoras de la mutación *PIG-A* podrían estar presentes en muy bajas frecuencias en individuos normales. Para probarlo se diseñó una metodología que por medio de la citometría de flujo, permitiera detectar las células mutantes *PIG-A* (Peruzzi y cols., 2010).

La mayor parte de la información que se tiene acerca de la mutación deriva de la investigación realizada en pacientes con HPN. En esta enfermedad, una fracción importante de células de la médula ósea son mutantes *PIG-A*. Se tiene la hipótesis de que la alta frecuencia de mutaciones *PIG-A* es resultado de la expansión clonal de las células mutantes *PIG-A* pre-existentes (Young, 2002).

El método de rutina para el diagnóstico de HPN es la tinción de sangre periférica con anticuerpos conjugados con fluorocromos contra proteínas dependientes de GPI, seguido por la medición de la frecuencia de las células mutantes por citometría de flujo (Hall y Rosse, 1996). Uno de los síntomas característicos de la HPN (y el origen del nombre de la enfermedad) es la hemoglobina en la orina, causada por la lisis mediada por complemento C5b-9 (Hernández y cols., 2008; Wilcox y cols., 1991).

Si bien el proceso de lisis de las células mutantes puede representar un factor que complica el estudio de las mutaciones *Pig-a* en E, los datos sugieren que en los roedores la lisis intravascular no es tan elevada como para evitar la detección de la mutación por deficiencia de anclaje GPI (Miura y cols., 2009; Phonethepswath y cols., 2010).

1.7.1 Principio del ensayo *Pig-a*

El ensayo consiste en detectar mutaciones somáticas por medio de citometría de flujo. En una célula normal un número de proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico llegan a unirse covalentemente a la molécula de GPI. Estas proteínas dependientes de GPI aparecen en la superficie celular, y pueden ser detectadas por los anticuerpos apropiados conjugados con fluorocromos. En una célula con una mutación *Pig-a*, el ancla GPI no se sintetiza, por lo tanto, las proteínas que requieren este anclaje permanecen o se degradarán en el citoplasma.

Al realizar el análisis por citometría de flujo, el linaje de células puede ser identificado mediante el uso de anticuerpos contra la estirpe de células específicas y de la proteína dependiente de GPI; las células *Pig-a* mutantes pueden ser reconocidas por el hecho de que serán negativas cuando se hacen reaccionar con uno o más anticuerpos específicos para proteínas dependientes de GPI, en la **Figura 1** se representa una célula normal y una célula mutante *Pig-a* (Karadimitris y Luzzatto, 2001).

La inactivación por mutación de una sola copia del gen, ocasiona la aparición del fenotipo de superficie "GPI-negativo", esto es, la ausencia de las proteínas que necesitan de GPI para unirse a la membrana celular (Peruzzi y cols., 2010).

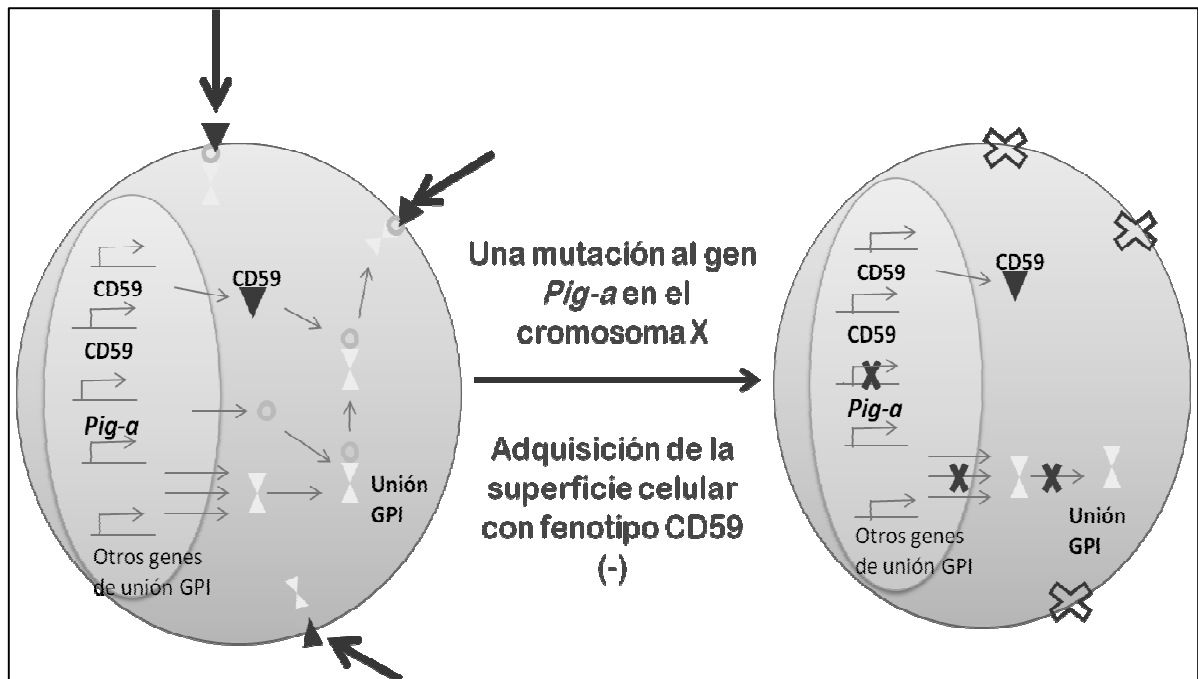


Figura 1. Célula normal y célula mutante *Pig-a*. A la izquierda se representa una célula que muestra la expresión de CD59 y GPI. El producto del gen *Pig-a* es sólo uno de varios genes necesarios para formar GPI, sin embargo, *Pig-a* es el único que se encuentra en el cromosoma X. A la derecha se observa que un único evento mutacional en el gen *Pig-a* (cromosoma X) tiene el potencial para interferir con la expresión de la superficie celular de todas las proteínas dependiente de GPI, incluyendo CD59. Este evento es raro, pero se ha sugerido que puede ser medido utilizando la citometría de flujo (Modificado de Bryce y cols., 2008).

Hoy se sabe que la mutación en el gen *Pig-a* tiene lugar en la célula madre hematopoyética después de la inactivación del cromosoma X, por consiguiente las mutaciones producidas en el alelo inactivo, son fenotípicamente silenciosas (Hernández y cols., 2008).

El ensayo de *Pig-a* ha sido descrito en E y Ret de ratón y rata; linfocitos T de rata; en E del mono *Rhesus* y en granulocitos humanos (Araten y cols., 1999; Bryce y cols., 2008; Dobrovolsky y cols. 2008; Miura y cols., 2008a, b; Phonetepswath y cols.2008). El modelo animal que se ha elegido para el ensayo ha sido la rata (Pfuhler y cols., 2009).

1.8 Mutágenos y Mutagénesis

Los mutágenos son agentes físicos o químicos capaces de inducir un cambio heredable en la secuencia del genoma de los organismos, este cambio es hereditario se denomina mutación (Griffiths y cols., 2000). El material genético es estable; sin embargo, las mutaciones ocurren espontáneamente, con frecuencias muy bajas en las células que aparentemente no están expuestas a agentes mutagénicos externos. La exposición a mutágenos incrementa las frecuencias de mutación por arriba de las frecuencias “de fondo”. Por lo general, la frecuencia de mutación está en proporción directa a la dosis del mutágeno aplicado, aunque en la relación dosis-respuesta pueden presentarse patrones más complejos (De la Rosa y Ruiz, 1997).

N-etil-N-nitroso urea (ENU) es un mutágeno que inicialmente fue usado con una alta eficiencia en fagos T2 tratados (Loveless y Hampton, 1969). Desde entonces ENU ha sido utilizado en una amplia variedad de sistemas de pruebas de mutación como un control positivo de las sustancias de estudio de genotoxicidad y como un medio de inducción de mutaciones nuevas (Shibuya y Morimoto, 1993).

ENU posee doble acción, una de etilación y otra de carbamilación. A su vez, es un agente alquilante directo y se ha demostrado esta acción. Cuando el ADN se trató *in vitro* o *in vivo* con ENU, se identificaron los sitios reactivos tal como se muestran en la **Cuadro I** (Goth y Rajewsky, 1974; Singer y cols., 1981; Pegg, 1983; Zielenska y cols., 1988; Singer y Dosanjh, 1990; van Zeeland y cols., 1990).

Cuadro I. Productos del ADN después de la exposición a ENU.

Producto	Porcentaje total de etilación del ADN	Producto	Porcentaje total de etilación del ADN
Adenina		Citosina	
N-1	~ 0.1	O²	2
N-3	4	N-3	~ 0.3
N-7	0.6		
Guanina		Timina	
N-3	1.5	O²	7
O⁶	8	N-3	0.4
N-7	12	O⁴	2.5
N total	20%	Fosfatos	58
O total	80%		

Tomado de Singer y Dosanjh (1990)

ENU también causa mutaciones de pares de bases al azar (Justice y cols., 1999). Durante la replicación del ADN, los pares de bases etiladas provocan un error de identidad y la introducción de mutaciones puntuales. Ocasionalmente pueden ocurrir pequeñas deleciones (Shibuya y Morimoto, 1993). En el testículo del ratón, ENU actúa con más eficacia en espermatogonias. En ratones, las mutaciones más comunes son A-T a T-A, transversiones o transiciones A-T a G-C (Justice y cols., 1999).

Noveroske y cols. (2000) determinaron que el 63% fueron mutaciones puntuales que dieron lugar a cambios en los aminoácidos, 26% causaron un “splicing” (corte y empalme) anormal, 10% dio lugar a un prematuro codón de terminación, y ~1% causaron mutaciones en las que un codón de parada se convirtió a un codón de aminoácido.

Los experimentos descritos por Bryce y cols. (2008), fueron diseñados para evaluar si la falta de anclajes GPI, especialmente en las proteínas CD59 y CD55, podría constituir la base de un ensayo de mutación *in vivo*, basado en medir la frecuencia de estas proteínas dependientes de GPI por medio de la citometría de flujo. Estos experimentos se realizaron en poblaciones de E de ratas; las frecuencias observadas para los animales expuestos a ENU eran, por lo general, mayores que en los testigos. Estudios posteriores describieron los procedimientos simplificados de manejo de sangre y pruebas de ensayo para el análisis de las frecuencias de mutación presentes en el gen *Pig-a* (Phonethepswath y cols., 2008).

1.9 Eritropoyesis

La médula ósea es el sitio donde se producen las células sanguíneas. A partir de la célula totipotencial, llamada célula madre hematopoyética o progenitora, se originan todas las células sanguíneas: E, leucocitos (que incluyen los distintos linfocitos) y plaquetas.

En los roedores la médula ósea y el bazo son los principales tejidos hematopoyéticos, en los cuales se lleva a cabo la eritropoyesis, en éstos las células madre se encuentran en constante proliferación y pasan por fases de diferenciación y maduración para dar origen a las células de la sangre (Hayashi y cols., 2000).

Los E son células altamente especializadas, que se dedican al transporte de la hemoglobina y el intercambio gaseoso en los pulmones y los tejidos periféricos. Maduran a partir de los Ret que contienen ácido ribonucleico (ARN) residual. Los Ret, a su vez se generan en la médula ósea a partir de los eritroblastos que pasan por una etapa de enucleación. Después de un breve período de tiempo en la médula ósea, los Ret se liberan en la circulación, donde se elimina su ARN residual y maduran a E (Kaushansky, 2006).

En condiciones homeostáticas, la maduración de Ret de roedores tarda de 2 a 3 días, desde su estancia en la médula ósea y su liberación a la circulación (Gronowicz y cols., 1984; Wiczling y Krzyzanski, 2008), en la **Figura 2** se muestra el modelo de eritropoyesis en rata y formación de mutantes *Pig-a*.

En comparación con el promedio de vida de un E (120 días en los seres humanos), la fase de desarrollo de los Ret es breve, sin embargo, se trata de un período de cambios rápidos. Los Ret se someten a una amplia remodelación de su membrana, cambios de volumen, y eliminación de los orgánulos y ribosomas.

Estos procesos de transformación garantizan que las funciones celulares críticas, tales como la producción de hemoglobina, el transporte de oxígeno, y flexibilidad, sean óptimas en los E (Ney, 2011).

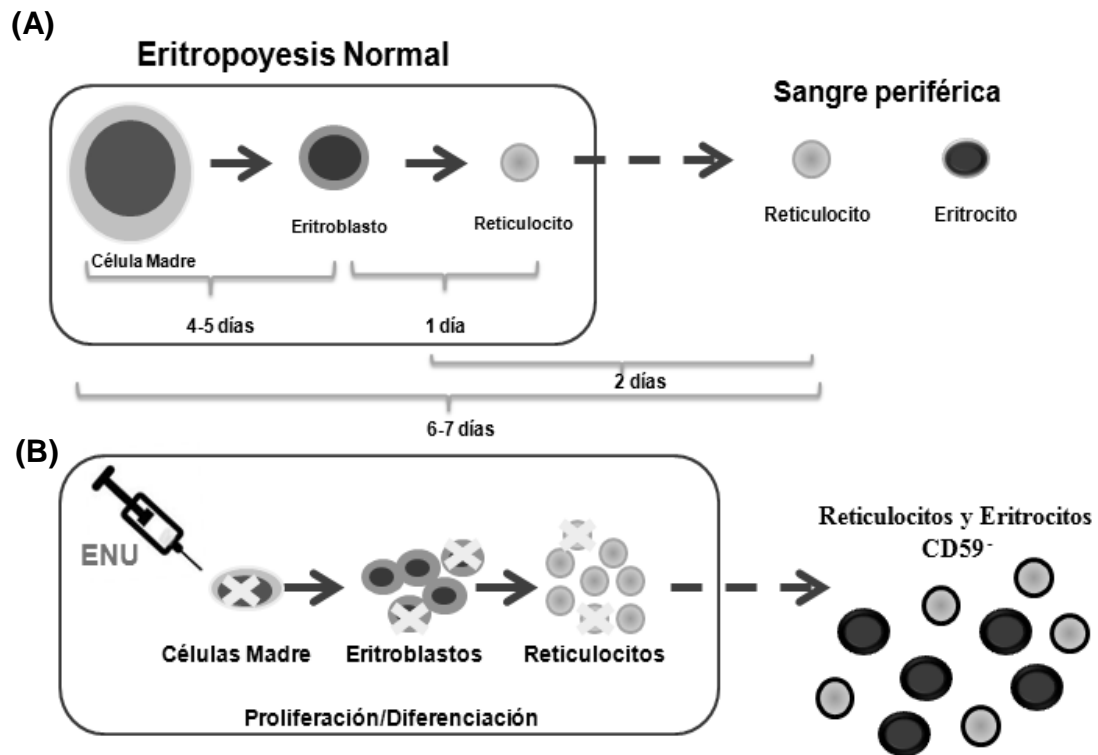


Figura 2. Eritropoyesis normal y formación de mutantes *Pig-a* en sangre periférica de rata. (A) Se muestra el tiempo que tarda la maduración de eritrocitos. La eritropoyesis normal se representa como la generación de E inmaduros a partir de células madre en la médula ósea (la parte superior izquierda de la figura) y el tránsito de las células (flecha punteada) en la periferia, donde la maduración culmina en E maduros. (B). Los E derivados de los precursores eritroides o células madre con mutaciones *Pig-a* se suministran de forma continua de la médula ósea a la sangre periférica. La inducción de mutantes con ENU inicia en las células madre o células progenitoras tempranas, éstas proliferan en la médula ósea y generan Ret mutantes (abajo a la izquierda de la figura), que también transitan hacia la periferia (Modificado de Miura y cols., 2009).

2. Pregunta de Investigación

¿La desnutrición grave está asociada con el incremento de mutaciones somáticas, tomando como marcador al gen *Pig-a*?

3. Justificación

La DES ha sido objeto de varios estudios tanto a nivel celular, bioquímico y citogenético. Se han realizado estudios con métodos citogenéticos como son las AC, ICH, MN y por medio del ensayo cometa, todos ellos *in vivo e in vitro*. Así mismo, se ha demostrado que la DES induce un daño al material genético de las células; sin embargo, la información que se tiene acerca del daño génico asociado a la DES es mínima. Por lo que el estudio de las mutaciones somáticas resulta esencial para analizar la posible inestabilidad génica que puede surgir de la deficiencia de nutrientes.

En las últimas décadas se ha considerado que el estudio de las mutaciones somáticas es tan importante como el análisis de las mutaciones en la línea germinal (que se heredan a la descendencia), principalmente porque las mutaciones somáticas son puntos clave en la patogenia de diversas enfermedades, dentro de ellas el cáncer. Por lo tanto, es importante evaluar los efectos genotóxicos de mutágenos en células de organismos desnutridos, que podrían provocar alteraciones en su función y conducir posiblemente a la carcinogénesis (Peruzzi y cols., 2010).

Si bien, hasta ahora, determinar la frecuencia de mutantes en células de humanos y de otros animales, ha sido sumamente difícil de medir, ahora se plantea que utilizando como centinela al gen *Pig-a*, se puede lograr su cuantificación.

Se propone que en el análisis con citometría de flujo, las células mutantes *Pig-a* pueden ser identificadas fácilmente, por medio del uso de un anticuerpo contra una proteína integral de membrana específica del tipo celular (Peruzzi y cols., 2010).

4. Hipótesis

Si la desnutrición origina daño al material genético a nivel de mutaciones, entonces se observará incremento en la frecuencia de mutantes en el gen *Pig-a*, en eritrocitos de ratas desnutridas administradas y no administradas con un mutágeno.

5. Objetivos

Objetivo General

Determinar si la desnutrición produce mayor susceptibilidad a mutaciones en reticulocitos y eritrocitos de ratas desnutridas mediante el análisis de mutantes *Pig-a*.

Objetivos Particulares

1. Evaluar por medio del análisis de la mutación somática de *Pig-a*, la frecuencia de mutantes en eritrocitos maduros (normocromáticos, E) y en eritrocitos jóvenes (reticulocitos, Ret) provenientes de ratas bien nutridas.
2. Determinar la frecuencia de mutantes en E y Ret de sangre periférica de ratas con DES grave por medio del análisis de la mutación somática de *Pig-a*.
3. Evaluar por medio del análisis de la mutación somática de *Pig-a*, la frecuencia de Ret y E mutantes en ratas bien nutridas.

4. Determinar la frecuencia de Ret y E mutantes en ratas con DES grave por medio del análisis de la mutación somática de *Pig-a*.
5. Comparar las frecuencias de mutación en el gen a *Pig-a*, en ratas bien nutridas y ratas con DES grave, expuestas a ENU.

6. Método

6.1 Inducción de desnutrición durante la lactancia

Este estudio se realizó de acuerdo a las guías aprobadas institucionalmente por la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, que están de acuerdo con las pautas internacionales para el manejo de animales de experimentación. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar producidas en el Bioterio de la misma Universidad, en donde se contó con un lugar para mantener esta especie en condiciones controladas. Se utilizó el método por competencia de alimento durante la lactancia (Ortiz y cols., 1996) para inducir la DES. Al día siguiente de su nacimiento, las ratas se distribuyeron en dos lotes:

- Lotes experimentales (Desnutridas o DN) en los cuales se colocaron 16 crías con una nodriza.
- Lote testigo (Bien Nutridas o BN), en el que se colocaron 6 crías con una nodriza.

Las crías se pesaron cada dos días, durante el experimento. Los datos registrados se utilizaron para calcular el déficit de peso de cada individuo y así determinar el grado de DE que presentaron las crías. Bajo este criterio, se consideraron que las ratas con un déficit de peso mayor de 40% presentaron DES de tercer grado.

A partir de la edad de 21 días (destete) se controló la ingesta de alimento de las crías para mantener la DES grave, para lo cual se colocó la mitad de alimento al lote experimental con base al alimento colocado al lote testigo, se dio seguimiento de la cantidad de alimento consumido desde el día 21 hasta el día 65 de edad de las ratas, así como el peso y grado de DES del lote experimental.

6.1.1 Estandarización del modelo de inducción de Desnutrición

Se realizó la estandarización del método de inducción de DES por competencia de alimento en ratas de la cepa Wistar, debido a que en el laboratorio de Biología celular y citometría de Flujo no se tenía estandarizado el modelo después del destete (21 días de edad); por lo que la inducción de la DES se mantuvo hasta los 65 días de edad, realizando la restricción de alimento al 50% correspondiente al alimento colocado al lote de ratas testigo. Se realizó el registro de los pesos de los lotes testigo y experimental y se estimó el grado de DES con base al déficit del 40% de peso en comparación al peso promedio del lote testigo.

6.2 Tratamiento con ENU

Se administró ENU, diluido en amortiguador de fosfatos (PBS, pH 6), vía oral de la siguiente forma:

Al día 14 de edad, se administraron dos dosis, una de 9.88 mg y otra de 19.87 mg/kg de peso/3 días en intervalos de 24 horas (Phonethepswath y cols., 2010). Teniendo como dosis finales 29.64 mg y 59.61 mg. Se redondearon las cifras de las dosis para fines de comunicación de los resultados (30 y 60 mg). Con base a la dosis administrada, se conformaron los siguientes grupos de estudio:

Grupo 1 ratas BN sin ENU (BN control $n=8$)

Grupo 2 ratas DN sin ENU (DN control $n=5$)

Grupo 3 ratas BN con ENU, dosis 10 mg/kg/3días (BN30mgENU $n=8$)

Grupo 4 ratas BN con ENU, dosis 20 mg/kg/3días (BN60mgENU $n=8$)

Grupo 5 ratas DN con ENU, dosis 10 mg/kg/3días (DN30mgENU $n=5$)

Grupo 6 ratas DN con ENU, dosis 20mg/kg/3días (DN60mgENU $n=5$)

6.3 Toma de muestra de sangre periférica

A los 14, 23, 30, 37, 44, 51, 58 y 65 días de edad se tomó una muestra de sangre periférica de la vena caudal con ayuda de un bisturí. Se obtuvieron de 30 a 60 μ L de sangre, esta fue colocada en tubos previamente heparinizados que se mantuvieron a 4°C hasta proceder al marcaje de las muestras (Pho nethepswath y cols., 2010).

6.3.1 Detección de la mutación *Pig-a* (Marcaje de las muestras)

Después de la colecta de sangre periférica, se tomó 30 μL de ésta y se transfirió a tubos que contenían 100 μL de solución de heparina (500 U/mL PBS). A cada muestra (130 μL) se le adicionó 155 μL de PBS y se resuspendió por pipeteo suave, después se centrifugó a 800 g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 155 μL de PBS, se mezcló suavemente. Posteriormente 150 μL de esta suspensión se transfirió a un tubo de polipropileno en el que previamente se colocaron 100 μL de la siguiente mezcla: 3 partes de anti CD59-PE (anticuerpo contra CD59 conjugado con Ficoeritrina, para detectar la mutación por deficiencia en la expresión de esta proteína) + 17 partes de PBS con 2% de suero fetal bovino.

Las muestras se incubaron en hielo por 30 minutos, después se hicieron 2 lavados con 1 mL de PBS a 800 g durante 5 minutos en cada lavado, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de solución de intercalante de ácidos nucleicos SYTO 13 a una concentración de 157 nM, preparado en PBS (para diferenciar entre Ret y E, con base al contenido de ARN), se incubó a 37°C por 30 minutos. Después de la incubación, las muestras se colocaron en hielo hasta su análisis por citometría de flujo (Phonethepswath y cols., 2010).

6.3.2 Muestra de calibración (muestra “Pseudomutante”)

Se preparó una muestra de calibración para cada día de toma de muestra y análisis, de la siguiente forma: se colocó el 50% de células de la muestra de la rata que fue administrada con el vehículo PBS sin marcaje de CD59 PE y 50% de células de la muestra marcada con CD59 PE de la misma rata, el objetivo de esta muestra fue para la calibración de los fotomultiplicadores y para ubicar las gráficas de punto los cuadrantes las diferentes poblaciones mutantes de las de tipo salvaje (Phonethepswath y cols., 2010).

6.3.3 Análisis por citometría de Flujo

Se utilizó el citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson) con láser de argón a 488 nm de excitación, así como el paquete computacional Cell Quest (versión 3.0.1, Becton Dickinson) para la adquisición de los datos obtenidos. Se adquirió 1×10^6 células y se desplegaron en gráficas de punto (*dot plot*) siguiendo una estrategia de selección de la región de análisis.

6.4 Selección del análisis de las muestras por citometría de flujo

Debido a que el ensayo *Pig-a* no se encontraba estandarizado a las condiciones del laboratorio de Biología celular y citometría de Flujo, se realizaron distintas estrategias de marcaje de las células, así como diferentes métodos de análisis.

De las pruebas realizadas con el anti CD59-PE, la concentración de 10 μ L fue adecuada, así como la concentración de 157nM de SYTO 13 para el ensayo por tener correspondencia con el trabajo reportado por Phonethepswath y cols. (2010).

Con base a la previa selección del análisis de las muestras, se realizó la primera región con “Forward Scatter” (tamaño) contra “Side Scatter” (complejidad interna celular) para delimitar la región de células a analizar. Una segunda región se delimitó con FSC-Height contra SYTO 13 para excluir células nucleadas. La tercera región se hizo con FL2-Área contra FL2-Width para excluir dobletes y agregados celulares las gráficas de punto de la estrategia de análisis de muestran en la **Figura 8**.

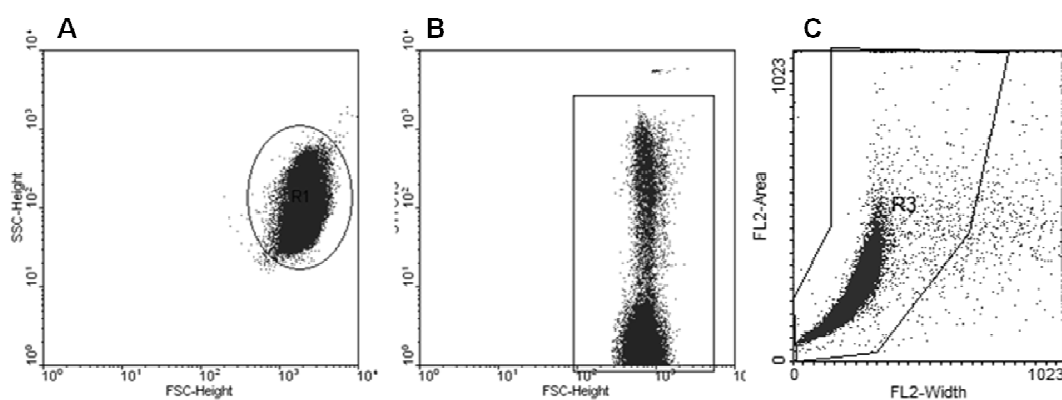


Figura 8. Estrategia de análisis. Se muestra las gráficas de punto (*dot plot*) en **A** la región de análisis de las células de interés, en **B** la segunda región para separar los E de leucocitos y en **C** la tercera región fue para eliminar los dobletes y agregados.

La muestra de calibración se realizó cada día de toma de muestra y en la **Figura 9** se muestra la gráfica de punto donde se pueden identificar las poblaciones negativas y positivas del ensayo *Pig-a*.

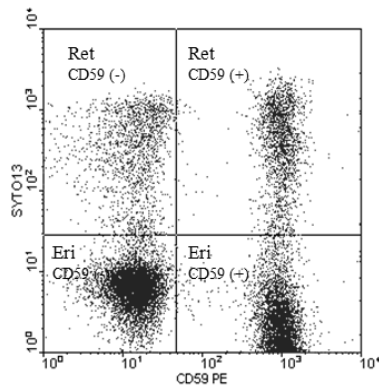


Figura 9. Muestra de calibración. Se muestra la gráfica de punto (*dot plot*) en el cuadrante superior izquierdo se presenta la población de Ret-Mut, en el cuadrante superior derecho se muestran Ret positivos a CD59. En los cuadrantes inferior izquierdo se ubican los E-Mut y en el cuadrante derecho los E positivos a CD59 (no mutantes).

Para la adquisición y análisis de las células, se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón de 488 nm de excitación, el software Cell Quest para la adquisición y el software WinMDI 2.9 para el análisis de los datos.

Las células fueron adquiridas en un promedio de 2000 células por segundo, la frecuencia de Ret y E fue determinada por el análisis de 1 millón de células totales.

6.5 Análisis estadístico de los resultados

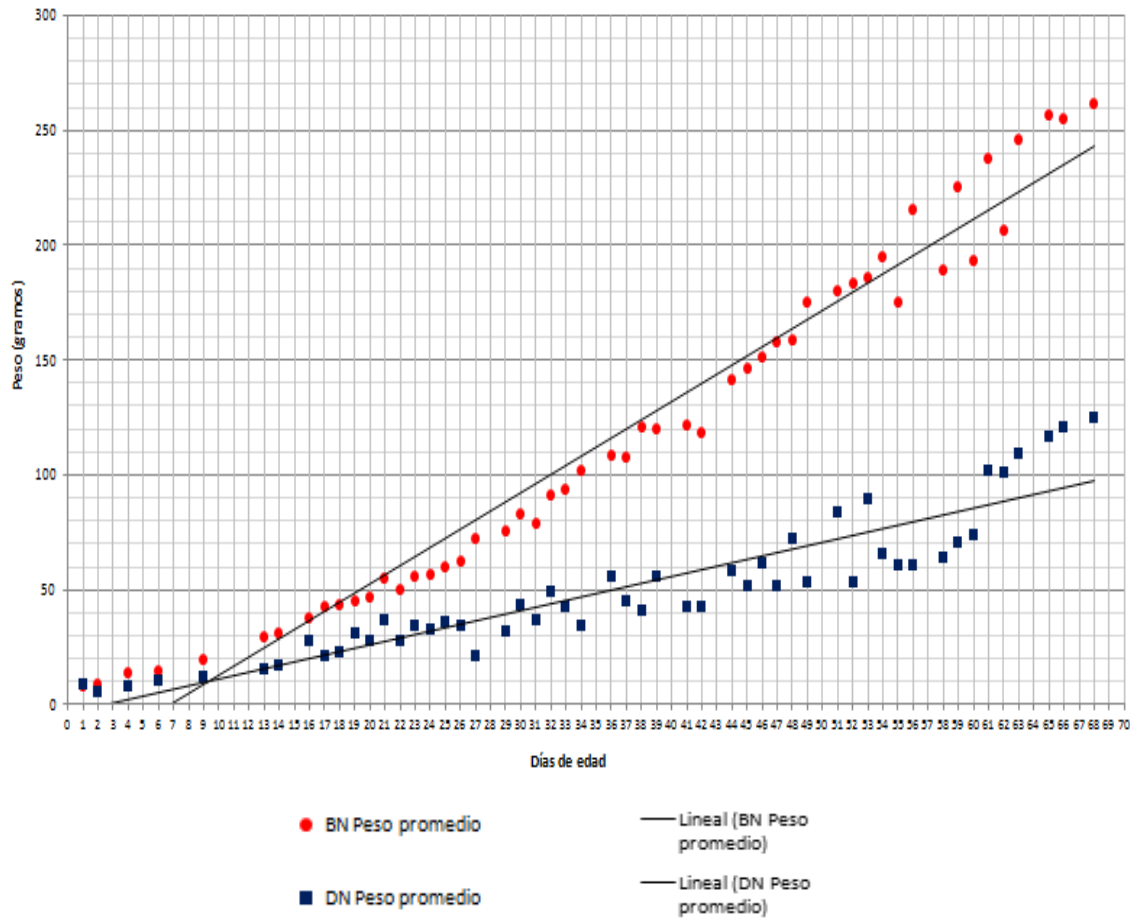
Para cada grupo se calculó la frecuencia de reticulocitos Mutantes (Ret-Mut) y eritrocitos mutantes (E-Mut) por tiempo, con la finalidad de conocer la diferencia estadística entre los grupos no tratados con respecto a los grupos tratados con ENU, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney con una $p \leq 0.05$. Los cálculos se efectuaron usando el paquete estadístico Graph Pad Prism 5.04.

7. Resultados

7.1 Peso de las ratas

Se utilizaron 24 ratas bien nutridas (BN) y 15 ratas desnutridas (DN) de 14 días de edad, las cuales fueron distribuidas en los diferentes grupos tratados y no tratados con ENU. En la **Gráfica 1** se muestran los pesos de las ratas BN y DN por día de edad.

El peso promedio de las ratas BN y DN de un día de edad fue de 8.4 ± 0.5 g, al inducir la desnutrición experimentalmente; el peso promedio a los 14 días de edad de las ratas BN fue de 31.7 ± 2.1 g y el de las ratas con DN de tercer grado fue 17.2 ± 6.3 g.



Gráfica 1. Pesos de las ratas. Se muestra el promedio de los pesos de los lotes testigo (BN) y experimental (DN) por día de edad. El peso de las ratas DN fue significativamente menor que el de las ratas BN ($p \leq 0.05$).

En el **Cuadro II** se muestra los pesos promedio de las ratas BN y DN así como el porcentaje de déficit de peso. Después de los 14 días de edad (semana 0) hasta los 65 días de edad (semana 7) Durante todo el experimento, las ratas DN se mantuvieron con DES de tercer grado.

Cuadro II. Peso (gramos) de las ratas Bien Nutridas y Desnutridas

Días de edad	Bien Nutridas	Desnutridas	% Déficit de peso
14 (semana 0)	31.7±2.1	17.2±6.3	45.7
23 (semana 1)	55.9±3.0	32.1±13.5	42.5
30 (semana 2)	83.1±4.3	44.2±18.3	46.9
37 (semana 3)	108.3±7.1	45.5±16.6	57.9
44 (semana 4)	141.9±8.3	58.4±18.4	58.9
51 (semana 5)	180.2±5.6	64.0±11.3	64.5
58 (semana 6)	216.2±7.4	84.3±16.8	61.0
65 (semana 7)	252.8±16.1	117.4±13.5	53.6

Los datos muestran que desde el inicio de los tratamientos hasta el final de los mismos, el método de inducción de DES por competencia de alimento y restricción del 50% de alimento funcionó en las ratas DN, manteniéndolas con un déficit de peso mayor al 40%.

7.2 Frecuencia de Reticulocitos mutantes

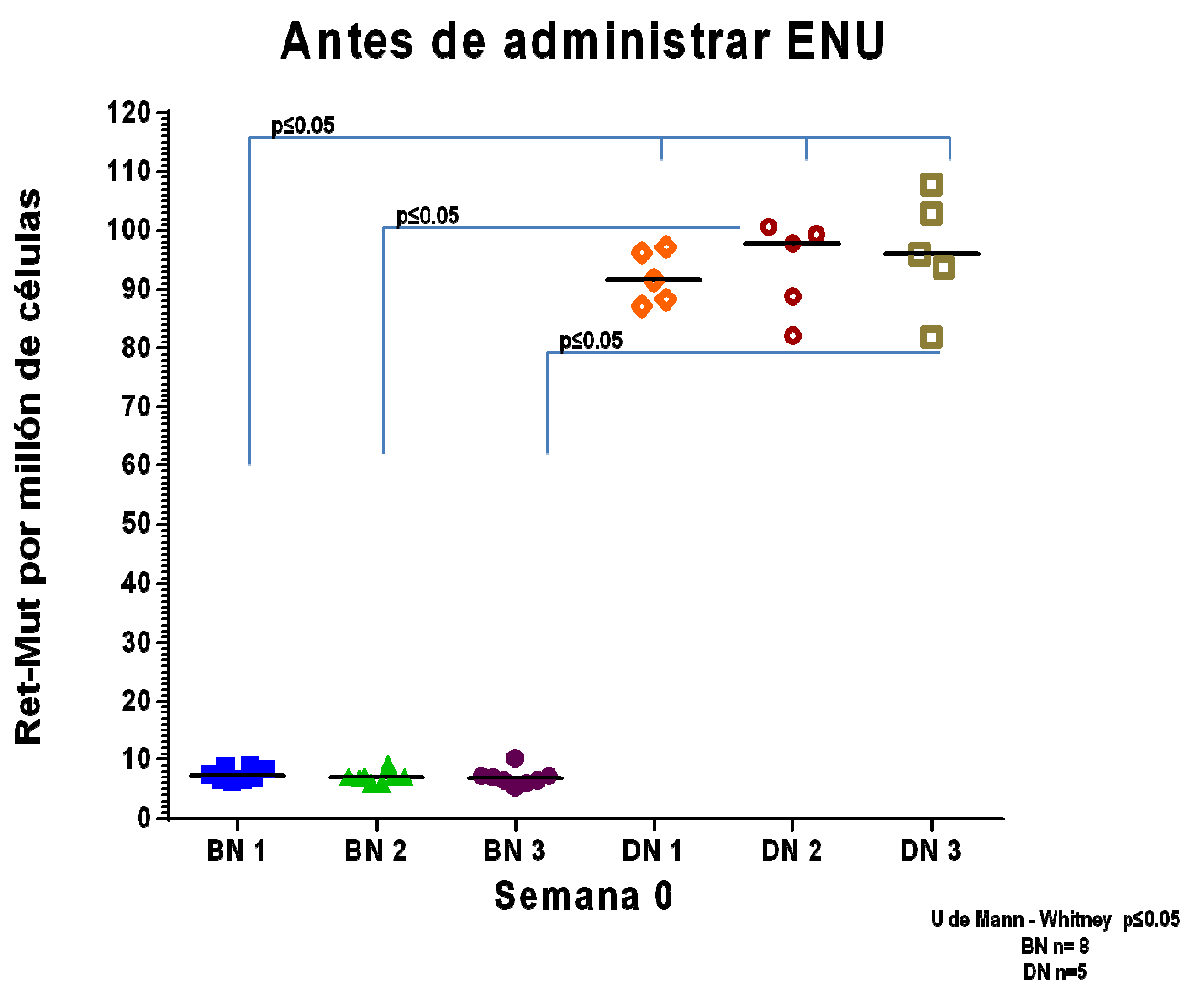
El análisis por citometría de flujo de un millón de células ($1/10^6$), determinó la frecuencia de Ret-Mut de cada uno de los grupos. En el **Cuadro III** se muestran los valores mínimos y máximos de su frecuencia, así como la media y mediana para cada uno de los grupos en cada uno de los tiempos (semana) de toma de muestra.

A los datos se les restó el número basal de mutantes para cada semana de toma de muestra y en las gráficas se presentan las medianas, así como la prueba estadística.

Cuadro III. Frecuencia de Ret-Mut por millón de células analizadas

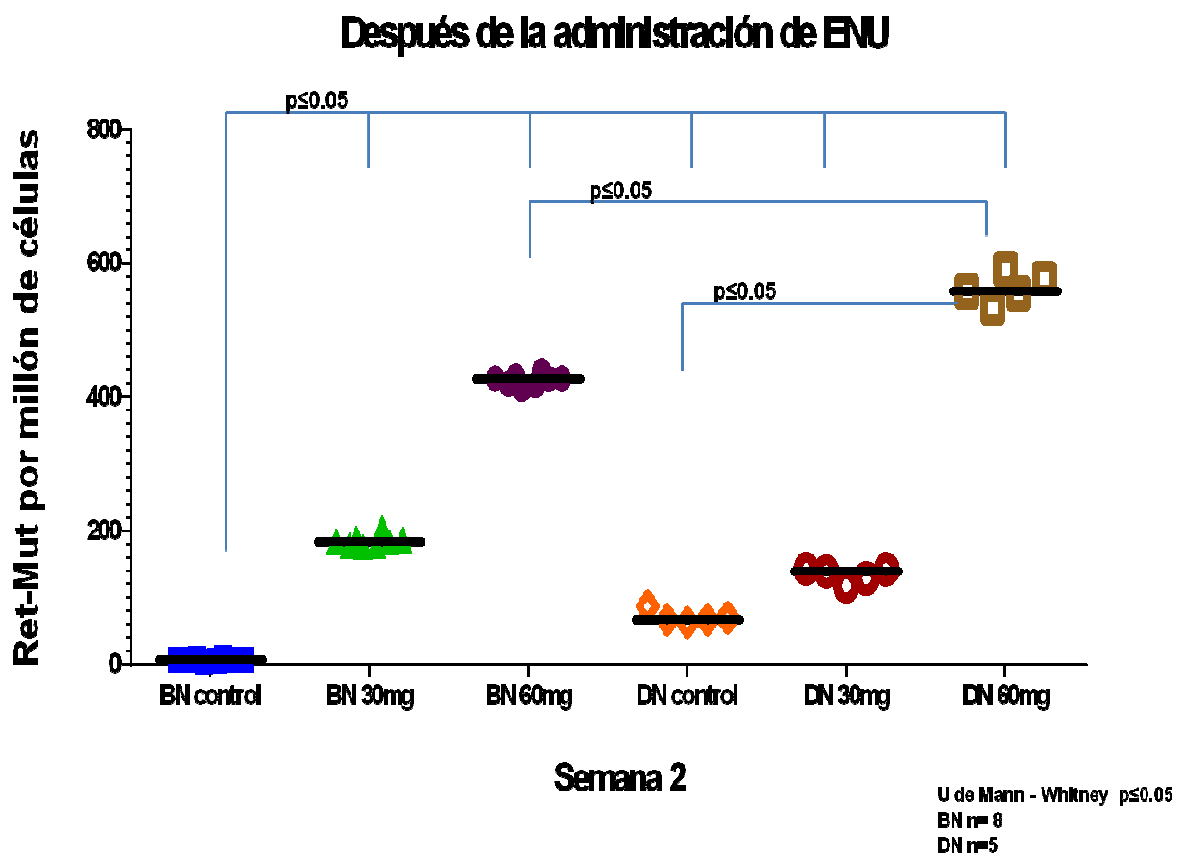
Semana		BIEN NUTRIDAS			DESNUTRIDAS		
		BN control	BN 30mg ENU	BN 60mg ENU	DN control	DN 30mg ENU	DN 60mg ENU
1	Min-Máx	6-8	6-9	5-10	87-92	82-100	82-107
	Mediana	7.3	7.1	6.8	91.6	97.8	96.0
	Media	7.6±0.4	7.1±0.3	7.0±0.5	92.1±2.2	93.8±3.5	96.5±4.4
2	Min-Máx	6-10	93-204	294-312	50-55	27-64	316-341
	Mediana	8.3	103.2	301.0	52.4	60.4	327.0
	Media	8.4±5.0	113.9±13.0	301.1±2.4	52.4±0.8	52.5±6.7	328.3±4.8
3	Min-Máx	5-10	176-204	412-439	63-87	117-143	533-591
	Mediana	8.0	183.7	427.0	67.1	139.8	558.8
	Media	7.8±0.6	184.9±3.3	425.0±3.0	70.9±4.2	134.4±4.5	563.5±10.1
4	Min-Máx	5-7	198-203	442-472	70-93	244-271	617-645
	Mediana	6.2	279.8	465.5	77.6	249.9	632.5
	Media	6.2±0.3	268.2±11.1	463.0±3.4	80.7±4.0	253.1±5.0	633.1±4.7
5	Min-Máx	8-9	293-330	476-514	79-98	281-301	846-876
	Mediana	9.5	307.5	495.8	82.6	296.6	873.6
	Media	9.4±0.1	307.8±4.1	494.3±5.2	87.6±4.3	292.6±4.0	865.4±6
6	Min-Máx	5-8	320-350	546-567	81-101	375-401	892-928
	Mediana	7.9	334.3	560.9	89.1	382.2	907.0
	Media	7.4±0.5	333.8±4.2	560.2±2.4	90.8±4.0	384.9±5.0	908.9±6.0
7	Min-Máx	4-9	448-469	585-649	76-102	428-460	1,028-1,055
	Mediana	7.1	463.8	596.1	101.4	452.0	1,044.0
	Media	7.2±0.7	461.8±2.4	602.0±7.2	94.4±5.1	444.7±6.3	1,041.0±4.7
8	Min-Máx	4-7	458-526	688-721	95-115	526-579	1,052-1,101
	Mediana	5.9	509.5	696.0	103.2	561.6	1,075.0
	Media	5.8±0.3	504.2±7.7	695.5±5.6	104.3±3.8	557.7±9.2	1,076.0±8.1

La frecuencia basal de Ret-Mut a los 14 días de edad (**semana 0**), de la primera toma de muestra, previa a la administración de ENU en los grupos BN no se encontraron diferencias significativas. En la **Gráfica 2** se muestran las medianas para cada uno de los grupos; la frecuencia basal de Ret-Mut en los grupos DN fue mayor en comparación con los BN.



Gráfica 2. Frecuencias individuales de Ret-Mut a los 14 días de edad. Se presenta la mediana y se indican las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre BN vs DN previa a la administración de ENU.

En la **semana 2** en el incremento de la frecuencia en BN 30mg y BN 60mg fue significativo en comparación con BN control. En la **Gráfica 3** se muestran las medianas para cada uno de los grupos correspondientes a la semana 2.

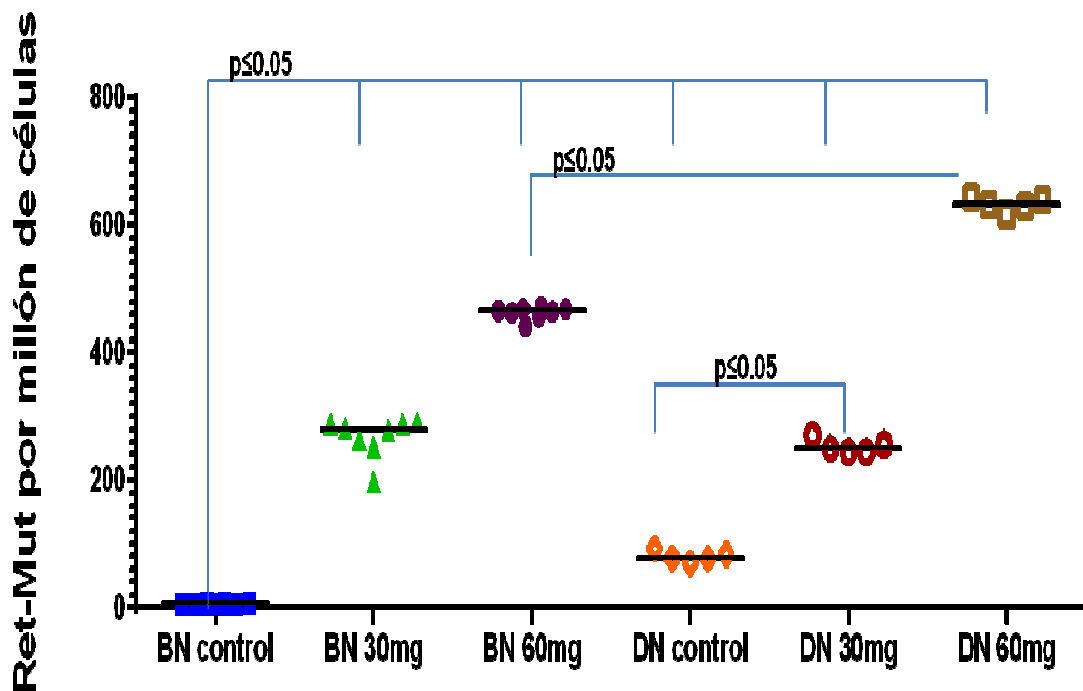


Gráfica 3. Frecuencias individuales de Ret-Mut en la semana 2. Se presenta la mediana y las diferencias significativas entre BN control vs DN: control; 30 mg y 60 mg. BN control vs BN: 30mg y 60 mg. BN 60mg vs DN 60mg. DN control vs DN 60mg.

La frecuencia en DN control y DN 30mg no presentó diferencias significativas. El grupo DN 60mg si presentó diferencias significativas al compararlo con DN control.

En los tres grupos DN fue significativamente mayor que en el grupo BN control, entre los grupos BN y DN 30mg no se presentaron diferencias significativas. En BN y DN 60mg se presentaron diferencias significativas con una $p \leq 0.05$.

Para la **semana 3** los Ret-Mut en BN control fue de 6.2 ± 0.3 , en el BN 30mg fue de 268.2 ± 11.1 y en el BN de 60mg fue de 463.0 ± 3.4 . Se presentaron diferencias significativas entre las frecuencias del grupo BN 30mg y BN 60mg con relación al grupo control. En la **Gráfica 4** se muestran las medianas para cada uno de los grupos.



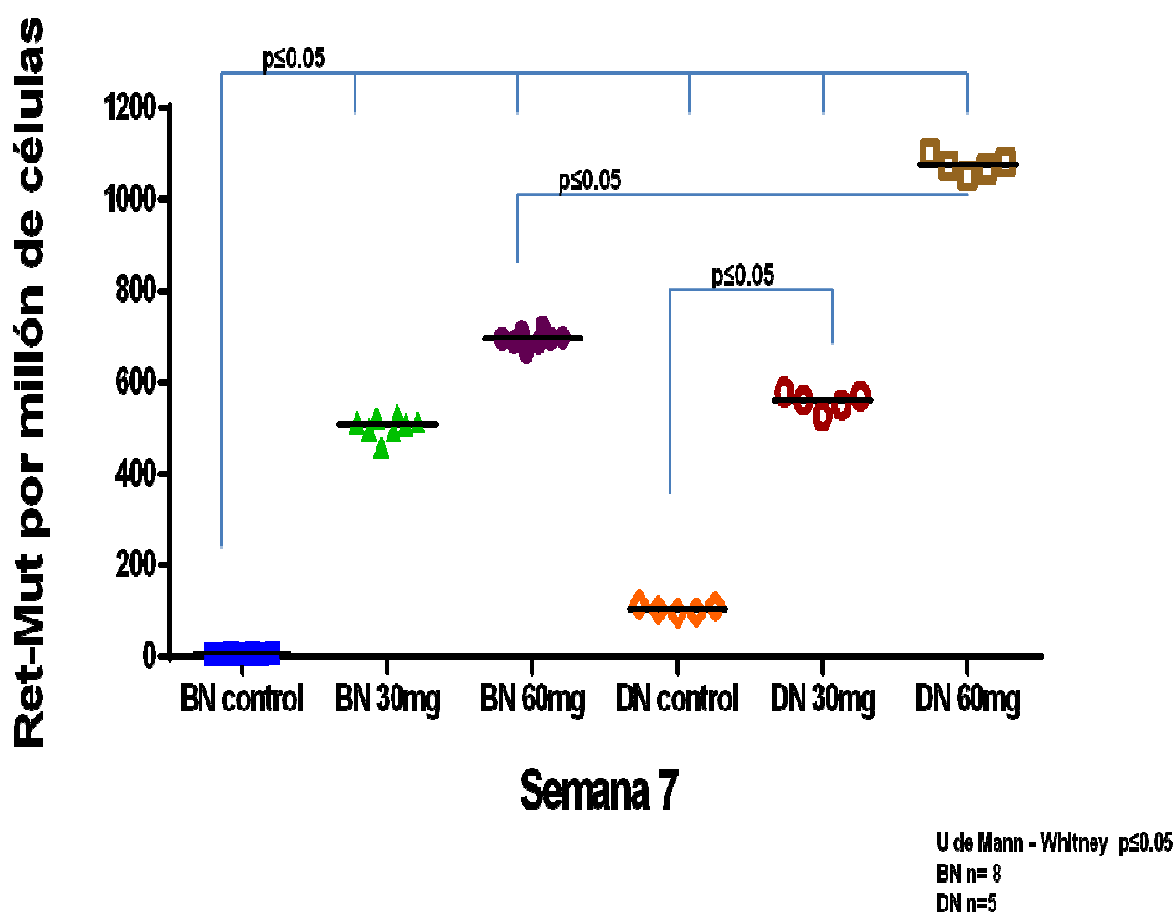
Semana 3

U de Mann - Whitney $p \leq 0.05$
 BN n= 8
 DN n=5

Gráfica 4. Frecuencias individuales de Ret-Mut en la semana 3. Se presenta la mediana y se indican las diferencias significativas entre BN control vs DN: control; 30 mg y 60 mg. BN control vs BN: 30mg y 60 mg. BN 60mg vs DN 60mg. DN control vs DN 30mg.

Las frecuencias de Ret-Mut en DN control fue de 80.7 ± 4.0 , para el DN 30mg fue de 253.1 ± 5.0 y la frecuencia de Ret-Mut en el DN 60mg fue de 633.1 ± 4.7 . Se presentaron diferencias significativas con una $p \leq 0.05$ entre las frecuencias de DN 30mg y DN 60mg contra DN control. Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre BN 60mg y DN 60mg con una $p \leq 0.05$. No se encontraron diferencias entre BN y DN de 30mg.

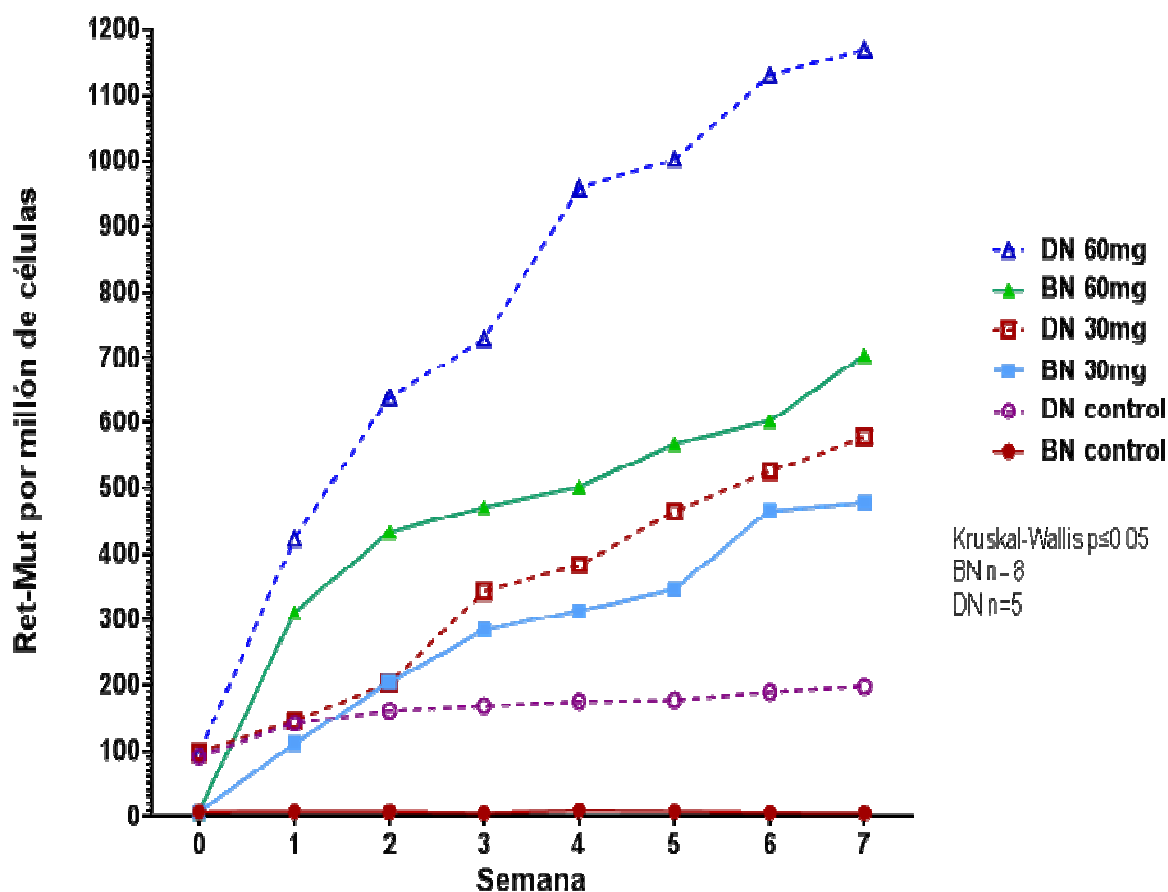
La frecuencia de Ret-Mut a los 65 días de edad (**semana 7**), es decir, la frecuencia final, en los grupos BN con los tratamientos fue de BN control 5.8 ± 0.3 y de los grupos BN 30mg y 60 mg fue de 504.2 ± 7.7 y 695.5 ± 5.6 , respectivamente. En la **Gráfica 5** se muestran las medianas para cada uno de los grupos.



Gráfica 5. Frecuencias individuales de Ret-Mut en la semana 7. Se presenta la mediana y se muestran las diferencias significativas entre BN control vs DN: control; 30 mg y 60 mg. BN control vs BN: 30mg y 60 mg. BN 60mg vs DN 60mg. DN control vs DN 30mg.

La frecuencia de Ret-Mut en los grupos DN fue de 104.3 ± 3.8 para el grupo DN control, 557.7 ± 9.2 para el grupo DN 30mg y $1,076.0 \pm 8.1$ para el grupo DN 60mg. La frecuencia final de Ret-Mut presenta diferencia significativa entre los grupos BN contra los grupos DN con una $p \leq 0.05$, siendo los grupos DN los que presentan la mayor frecuencia de Ret-Mut finales.

En la **gráfica 6** se muestra la cinética de los Ret-Mut para cada uno de los grupos de estudio. Se presentan las medianas para cada semana (0 a 7).



Gráfica 6. Cinética de Ret-Mut en las 7 semanas de muestreo. Se observaron diferencias significativas entre las medianas de BN y DN control; y entre BN y DN 60 mg con una $p \leq 0.05$. Las medianas de los BN y DN 30 mg no presentaron diferencias significativas.

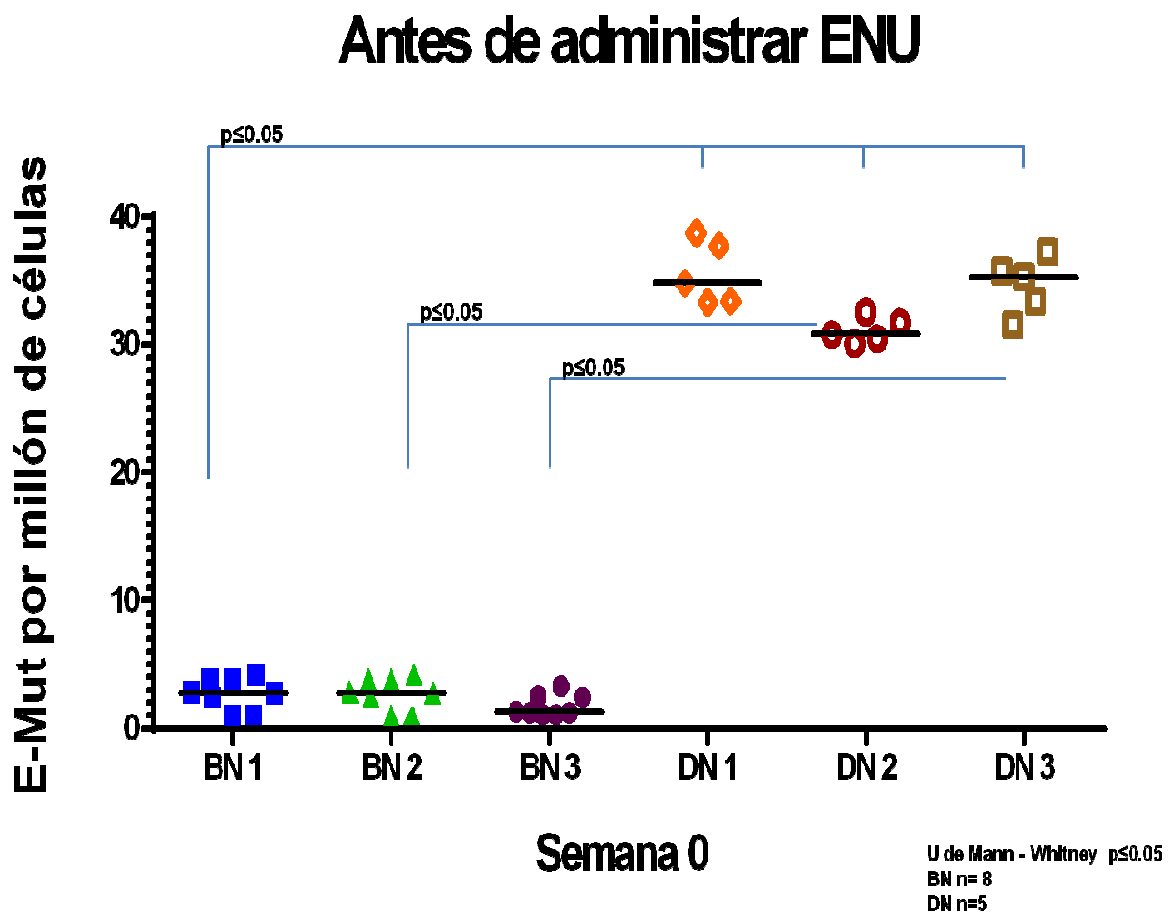
7.3 Frecuencia de Eritrocitos mutantes

Para determinar la frecuencia de E-Mut por medio de la citometría de flujo de 1 millón de células, se calculó la frecuencia de E con fenotipo negativo a CD59 de cada uno de los grupos en el **Cuadro IV** se muestran los valores de la media, mediana y rango para cada uno de los grupos en cada uno de los tiempos (semana) de toma de muestra. Todos los resultados se presentan como la frecuencia promedio de mutantes. En las gráficas los datos se presentan como el número de eritrocitos mutantes, a los dos se les restó el número basal de mutantes para cada semana de toma de muestra y se presentan las medianas, así como la prueba estadística.

Cuadro IV. Frecuencia de E-Mut por millón de células analizadas

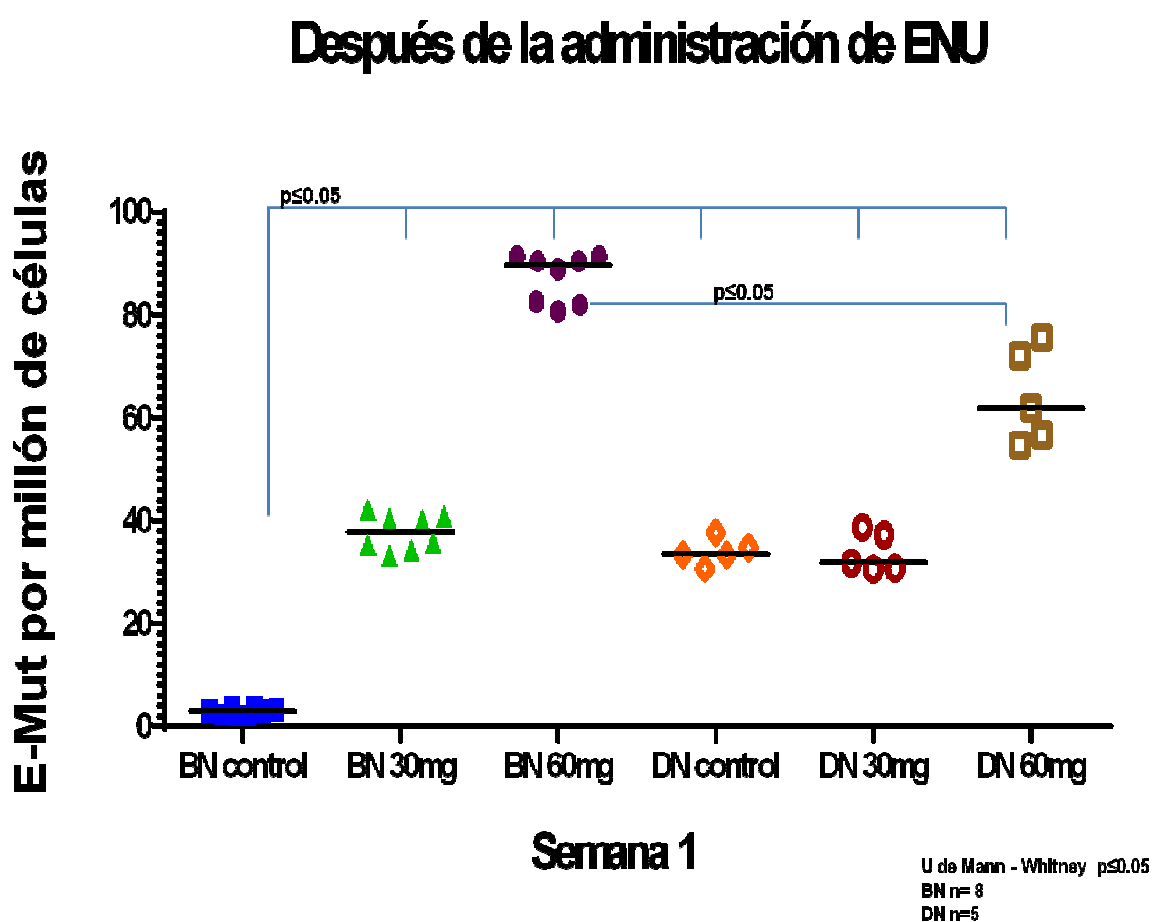
Semana		BIEN NUTRIDAS			DESNUTRIDAS		
		BN control	BN 30mg ENU	BN 60mg ENU	DN control	DN 30mg ENU	DN 60mg ENU
1	Min-Máx	1-4	1-4	1-3	33-38	30-32	31-37
	Mediana	2.8	2.8	1.3	34.9	30.9	35.3
	Media	2.7±0.4	2.7±0.4	1.8±0.3	35.6±1.1	31.2±0.5	34.7±1.0
2	Min-Máx	2-3	33-42	80-91	30-37	30-38	54-75
	Mediana	3.0	37.9	89.8	33.45	31.9	61.9
	Media	2.9±0.3	37.7±1.2	87.4±1.7	34.04±1.1	33.9±1.8	64.3±1.2
3	Min-Máx	1-4	54-67	122-145	17-26	48-59	166-189
	Mediana	3.4	61.6	133.6	19.4	50.2	178.2
	Media	3.4±0.5	61.2±1.42	133.8±2.7	20.7±1.5	51.1±2.0	179.1±4.1
4	Min-Máx	1-4	90-119	202-223	24-31	88-99	255-283
	Mediana	2.5	111.1	209.3	30.31	96.59	276.1
	Media	2.5±0.4	109.9±3.2	211.2±2.4	28.6±1.3	95.6±2.2	273.5±5.3
5	Min-Máx	2-5	139-185	220-288	29-38	150-161	350-375
	Mediana	4.2	159.1	279.5	36.9	157.3	368.2
	Media	3.7±0.5	159.2±6.2	268.7±9.0	35.69±1.5	156.2±2.0	364±4.5
6	Min-Máx	2-5	249-269	341-388	37-42	210-253	479-493
	Mediana	3.3	261.4	371.9	41.03	223.2	486.1
	Media	3.6±0.5	261.1±2.68	369.7±5.8	40.2±0.1	228.1±7.4	486.2±2.6
7	Min-Máx	2-4	290-308	420-471	40-44	283-286	567-577
	Mediana	3.174	310.9	445.8	41.91	284.3	569.9
	Media	3.2±0.3	308.1±3.4	447.5±4.5	42.27±0.8	285.1±0.6	571.3±1.9
8	Min-Máx	2-5	319-353	500-555	45-48	349-359	716-733
	Mediana	3.741	337	532	46.69	355	724.5
	Media	3.8±0.3	336.4±3.9	529.1±7.7	47.03±0.6	354.5±1.6	724±2.9

La frecuencia basal de E-Mut presenta diferencia significativa entre los grupos BN contra los grupos DN con una $p \leq 0.05$, siendo los grupos DN los que presentan la mayor frecuencia de E-Mut basales (**Gráfica 7**).



Gráfica 7. Frecuencias individuales de E-Mut a los 14 días de edad. Se muestra la mediana y las diferencias significativas entre BN control vs DN: control; 30 mg y 60 mg. BN 30mg vs DN 30mg. BN 60mg vs DN 60mg.

En la **semana 1** la frecuencia para BN control fue de 2.9 ± 0.3 , para el grupo BN 30mg fue de 37.7 ± 1.2 , para el grupo BN 60mg fue de 87.4 ± 1.7 . El incremento de la frecuencia promedio del grupo BN 30mg presentó diferencias significativas con relación al grupo BN control y el grupo BN 60mg fue significativamente mayor en comparación con el grupo BN control con una $p \leq 0.05$ (**Gráfica 8**).

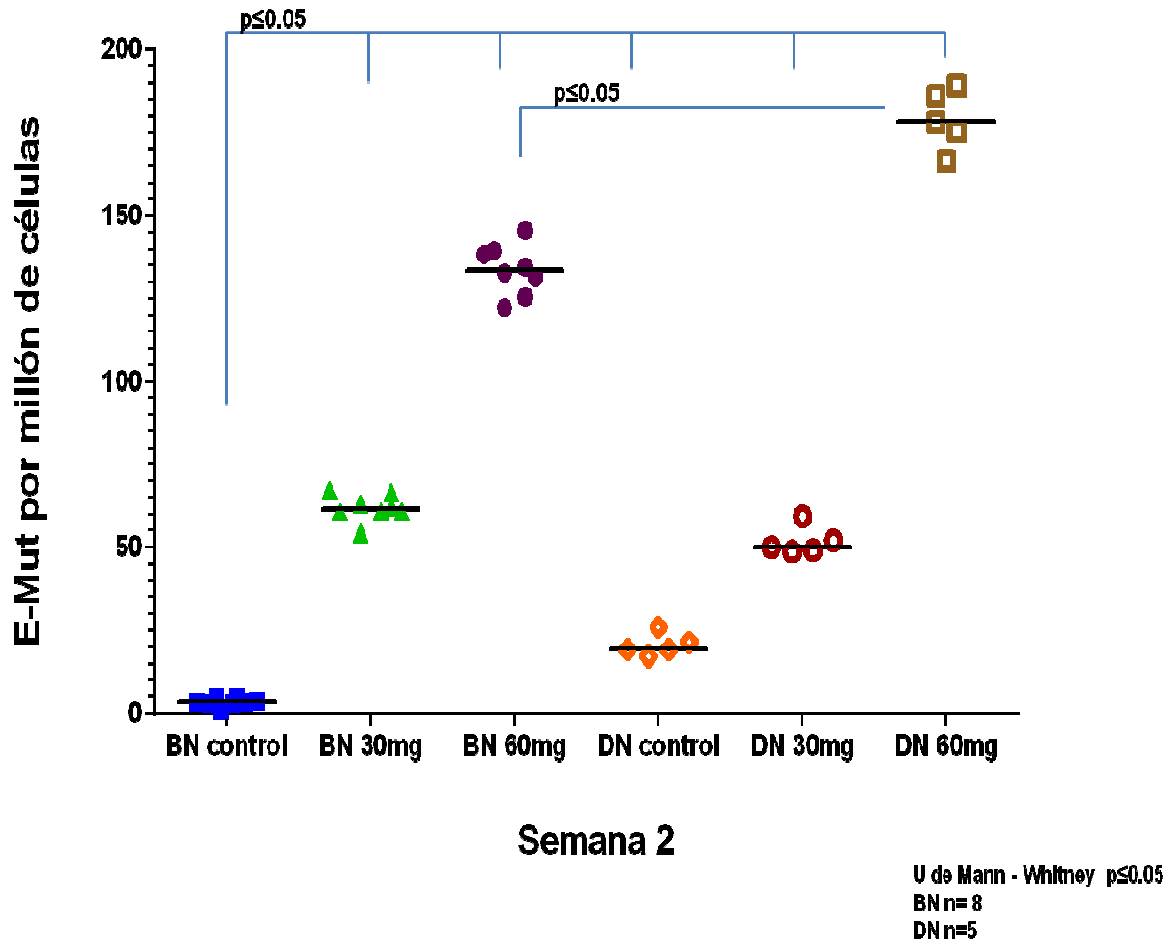


Gráfica 8. Frecuencias individuales de E-Mut en la semana 1. Se presenta la mediana y se muestran las diferencias significativas entre BN control vs DN: control; 30 mg y 60 mg. BN control vs BN: 30mg y 60 mg. BN 60mg vs DN 60mg.

En los grupos DN la frecuencia de DN control y DN 30mg no presentó diferencias significativas, DN 60mg no presentó diferencias significativa en comparación con DN control.

En los tres grupos DN se observó una frecuencia significativamente mayor comparados con BN control, no se presentaron diferencias significativas entre los grupo BN y DN 30mg, de igual modo en los grupos BN y DN 60mg. En cuanto a los controles, si hubo diferencias significativas entre BN y DN, siendo el DN el que presentó la mayor frecuencia.

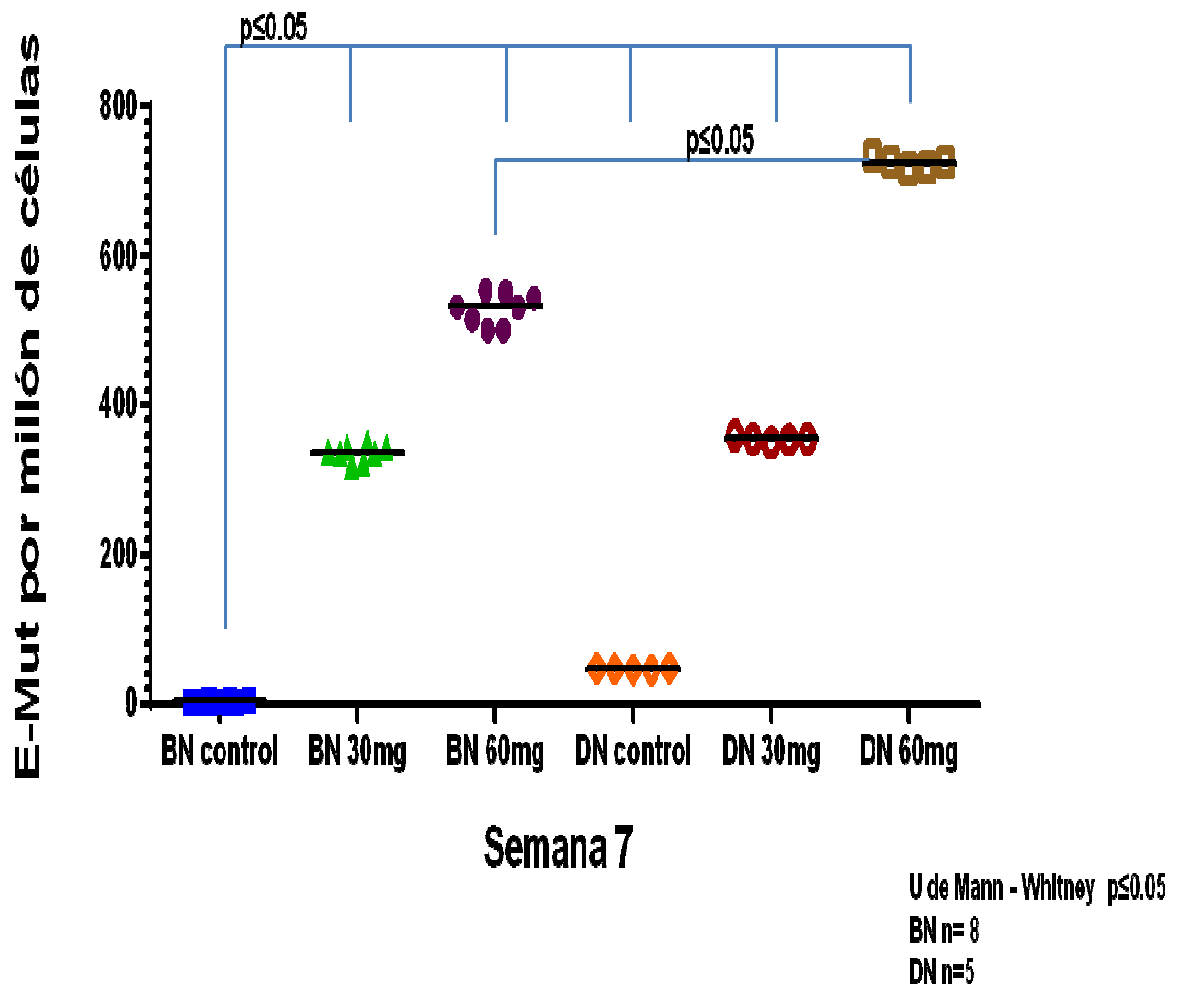
A la **semana 2** la frecuencia de E-Mut en el grupo BN control fue de 3.4 ± 0.5 , en el grupo BN 30mg fue de 61.2 ± 1.42 , para el grupo BN 60mg fue de 133.8 ± 2.7 . El incremento de la frecuencia en el grupo BN 30mg y BN 60mg fue significativo en comparación con el grupo BN control con una $p \leq 0.05$ (**Gráfica 9**).



Gráfica 9. Frecuencias individuales de E-Mut en la semana 2. Se presenta la mediana y se indican las diferencias significativas entre BN control vs DN: control; 30 mg y 60 mg. BN control vs BN: 30 mg y 60 mg. BN 60mg vs DN 60mg.

La frecuencia promedio del grupo DN control y DN 30mg no presentó diferencias significativas, el grupo DN 60mg si presentó diferencias significativa en comparación con el grupo DN control.

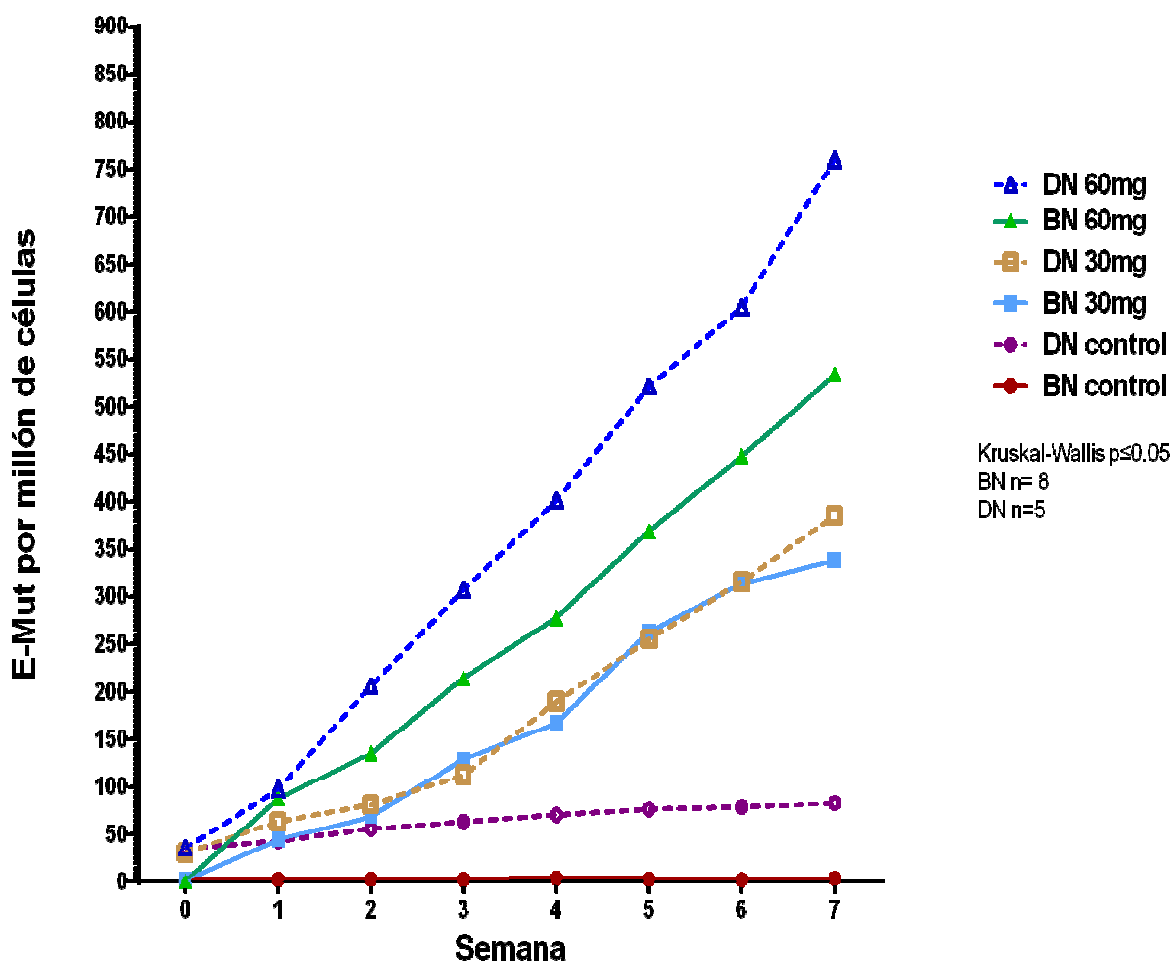
La frecuencia a los 65 días de edad (**semana 7**), fue de BN control 3.8 ± 0.3 y de los grupos BN 30mg y 60 mg fue de 336.4 ± 3.9 y 529.1 ± 7.7 , respectivamente (**Gráfica 10**).



Gráfica 10. Frecuencias individuales de E-Mut en la semana 7. Se presenta la mediana y se indican las diferencias significativas entre BN control vs DN: control; 30 mg y 60 mg. BN control vs BN: 30 mg y 60 mg. BN 60mg vs DN 60mg.

La frecuencia final de E-Mut presenta diferencias significativas entre los grupos BN contra los DN, siendo los grupos DN los que presentan la mayor frecuencia de mutantes E-Mut final.

En la **Gráfica 11** se muestra la cinética de los E-Mut para cada uno de los grupos de estudio. Se indican las medianas para cada uno de las semanas de tomas de muestra.



Gráfica 11. Cinética de E-Mut en las 7 semanas de muestreo. Se obtuvieron diferencias significativas entre las medianas de los grupos BN y DN control; y entre de los grupos BN y DN 60 mg con una $p \leq 0.05$. Las medianas de los grupos BN y DN 30 mg no presentaron diferencias significativas.

En el **cuadro V** se presenta un resumen del comportamiento de los mutantes Pig-a en Ret y E analizados en las 7 semanas de seguimiento.

Cuadro V. Resumen del comportamiento de las frecuencias de mutantes

Semana	*Diferencia significativa Ret-Mut	*Diferencia significativa E-Mut
0	*	*
1	Mismo comportamiento	*
2	*	*
3	*	Mismo comportamiento
4	Mismo comportamiento	Mismo comportamiento
5	Mismo comportamiento	Mismo comportamiento
6	Mismo comportamiento	Mismo comportamiento
7	*	*

8. Discusión

8.1 Modelo de inducción de desnutrición

Los modelos animales han sido ampliamente utilizados para el estudio de los efectos de la DES, el uso de los modelos tiene la ventaja de poder controlar diversos factores como son las infecciones que generalmente acompañan a la DES y el tratamiento farmacológico que implican. Existen métodos bien establecidos para la inducción de la DES en ratas durante la lactancia, ya que sus efectos durante esta etapa son determinantes para el desarrollo del individuo.

En el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, se ha utilizado el método de inducción de la DES por medio del método de competencia de alimento durante la lactancia. También se ha reportado ampliamente que este método es eficiente y reproducible para inducir la DES (Medina, 2005). En este trabajo se realizó una modificación después de los 21 días de edad (destete) que consistió en restringir el 50% de alimento al grupo experimental, con base al alimento colocado al lote testigo, de esta forma se registró el peso de los grupos DES hasta los 65 días de edad. Para determinar el grado de Des, el déficit de peso ha sido tradicionalmente utilizado como un buen indicador en ratas (Widdowson y McCance, 1975).

8.2 Ensayo *Pig-a*

El ensayo *Pig-a* es de reciente introducción en el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-I, por lo que su estandarización se logró adecuar a las condiciones del laboratorio, permitiendo realizar la detección de los fenotipos mutantes y el análisis de los mismos en dos poblaciones celulares de manera simultánea en todas las semanas de los experimentos.

Los reportes iniciales de los ensayos en roedores, utilizando el gen *Pig-a* como reportero de mutación somática fueron de Bryce y cols., 2008; Miura y cols., 2008 a, b y Phonethepswath y cols., 2008. Estos trabajos demostraron que el ensayo *Pig-a* reveló un aumento significativo en los fenotipos mutantes de E de ratones expuestos a potentes mutágenos. Asimismo, se evidenció que el ensayo presenta diversas ventajas, dentro de ellas se mencionan: es un ensayo relativamente rápido, de bajo costo, requiere muestras extremadamente pequeñas de sangre y tiene una extraordinaria sensibilidad al conjunto de mutágenos probados. La incorporación de un colorante de ácidos nucleicos en el procedimiento de marcaje, ha proporcionado los medios para medir por separado la incidencia del fenotipo mutante en Ret y E (Dertinger y Heflich, 2011).

Cabe mencionar que las ventajas de ensayo *Pig-a* fueron observadas en nuestro laboratorio, dando por sentado que este ensayo es transferible y altamente reproducible. Se ofrece así, la posibilidad de su uso para diversas aplicaciones en la investigación básica y clínica.

8.3 Frecuencia de Reticulocitos mutantes (Ret-Mut)

Las frecuencias de mutantes *Pig-a* han sido reportadas para ratas Wistar de 35-42 días de edad. Las frecuencias basales que se observaron no habían sido reportadas, debido a que las ratas empleadas en los experimentos fueron de 14 días de edad. A pesar de ello, los resultados son similares a los reportados por Bhalli y cols. (2011) de $3-6/10^6$ y Dobrovolsky y cols. (2010) de $5/10^6$. Las frecuencias de los autores corresponden a ratas mayores de 14 días de edad. Las frecuencias obtenidas en el presente estudio no están alejadas de las frecuencias basales reportadas, esto indica que no hay diferencia asociada con la edad (35-42 en estudios previos y 14 días en este estudio). También sugiere que los controles del ensayo fueron adecuados.

A la semana 3, después de la administración de ENU en los grupos BN, las frecuencias que reportamos son de $8.4/10^6$ para el grupo control, de $113.9/10^6$ para el grupo de 30mg y de $301.1/10^6$ para el grupo con 60mg de ENU. Estos resultados muestran frecuencias aproximadas a las reportadas por Dertinger y cols. (2011), quienes usaron la dosis de 60mg de ENU y reportaron $300/10^6$ Ret-Mut con los cuales concuerdan las frecuencias observadas.

En los grupos DN que se reportaron en la semana 0 $92.1/10^6$ en el control, $93.8/10^6$ en DN 30mg y $96.5/10^6$ en DN 60mg. Estos datos muestran que en los organismos DN las frecuencias espontáneas de mutantes son aproximadamente 13 veces más que las frecuencias reportadas en organismos BN.

El que existan frecuencias elevadas en los organismos DN es indicativo de que presentan daño en el ADN, éste ha sido reportado con ensayos citogenéticos como son los MN, sin embargo, un efecto positivo con base al aumento de frecuencias de mutantes asociado a la deficiencia de nutrientes, no había sido reportado en ensayos de mutación génica con base a la frecuencia de mutantes *Pig-a*, el daño en el ADN se ve reflejado en las frecuencias de mutantes reportadas.

Se ha reportado que ENU actúa a nivel de células madre eritropoyéticas (Miura y cols., 2009). En condiciones homeostáticas, la maduración de Ret de roedores tarda de 2 a 3 días, desde su estancia en la médula ósea y su liberación a la circulación (Gronowicz y cols., 1984; Wiczling y Krzyzanski, 2008), con base al tiempo de maduración se propone que en el grupo DN 30mg se está retrasando su maduración. Se requieren estudios complementarios para comprobar este efecto.

Con la dosis de 60mg se presentaron diferencias significativas a partir de la semana 2 y hasta la semana 7, siendo el grupo DN el que presentó la mayor frecuencia de Ret-Mut. Estos datos sugieren que la dosis de 60mg de ENU, es lo suficientemente potente para inducir mutantes *Pig-a* y que son los DN los más afectados con una dosis alta del mutágeno, a su vez, el grupo DN control muestra que las frecuencias de mutantes espontáneos más altas y esto demuestra que el daño en el material genético se encuentra asociado a la deficiencia de nutrientes.

8.4 Frecuencia de Eritrocitos mutantes

Las frecuencias de mutantes *Pig-a* han sido reportadas para ratas Wistar de 35-42 días de edad, las frecuencias observadas no habían sido reportadas, debido a que las ratas empleadas en los experimentos fueron de 14 días de edad. Las frecuencias de E-Mut espontáneos es decir, las frecuencias previas a la administración de ENU en la semana 0 en las ratas BN, son de $2.7/10^6$, estos datos son similares a los reportados por Miura y cols. (2009) con $3.9/10^6$ E-Mut, Dobrovolsky y cols. (2010) reportaron menos de $5/10^6$ mutantes y Phonethepswath y cols. (2010) reportaron $1.33/10^6$ E-Mut espontáneos.

A la semana 1, después de la administración de ENU en los grupos BN, las frecuencias fueron de $2.9/10^6$ para el grupo control, de $37.7/10^6$ para el grupo de 30mg y de $87.4/10^6$ para el grupo con 60mg de ENU. Estos resultados muestran frecuencias aproximadas a las reportadas por Dertinger y cols. (2011) $80/10^6$ E-Mut, usaron la dosis de 60mg de ENU.

Las frecuencias de E-Mut en el grupo BN control se mantuvieron oscilando entre los valores de $2-3/10^6$. En los grupos tratados con ENU las frecuencias se incrementaron durante todas las semanas de muestreo, llegando a frecuencias finales, después de 7 semanas de tratamiento, fueron de $336.4/10^6$ para el grupo BN 30mg y de $529.1/10^6$ en el grupo BN 60mg. Estos incrementos en las frecuencias en el tiempo son consistentes a lo reportado por otros autores.

Los datos muestran que en organismos DN las frecuencias espontáneas de mutantes son aproximadamente 10 veces más que las frecuencias reportadas en el grupo BN control.

En la semana 1 las frecuencias reportadas para los grupos DN fueron de $34.04/10^6$ para el grupo DN control, $33.9/10^6$ para el grupo DN 30mg y de $64.3/10^6$ para el grupo DN 60mg. En esta semana, se advirtió un efecto diferente, ya que, el grupo BN 60mg presentó mayor frecuencia de mutantes en comparación con el grupo DN 60mg.

La inversión de las frecuencias a la semana 1, con respecto a los grupos administrados con 60mg, sugiere que DN presenta un retraso en la respuesta a la inducción de mutantes. Se sugiere que probablemente este retraso sea producto del desfase que se puede estar presentando en la proliferación y diferenciación de las células madre eritropoyéticas, que es consistente con las frecuencias reportadas en este trabajo. Sin embargo se requieren estudios de proliferación y diferenciación para poder comprobarlo.

En la semana 2 se observaron frecuencias de $20.7/10^6$ en el grupo DN control, $51.1/10^6$ en el grupo DN 30mg y $179.1/10^6$ en el grupo DN 60mg. En esta semana se invirtió el comportamiento de las frecuencias de E-Mut siendo el grupo DN 60mg el que presentó la mayor frecuencia de mutantes.

De la semana 2 a la semana 5 se mantuvo el mismo comportamiento de las frecuencias entre los grupos BN y DN de 60mg, mientras que los grupos BN y DN de 30mg no presentaron diferencias significativas en la frecuencia promedio de E-Mut durante los experimentos.

Por otro lado, se especula que además de un desfase en la respuesta a ENU, también se puedan estar perdiendo mutantes de Ret y E debido a la eliminación de éstos por el propio organismo, en ambas estirpes celulares, al ser mutantes *Pig-a*, carecen de proteínas dependientes de GPI. Este hecho puede favorecer su depuración y consecuente eliminación del torrente sanguíneo e impedir que los Ret-Mut lleguen al final de su maduración.

Pese a estos puntos, lo que es consistente es que los grupos DN controles, presentan mayor frecuencia de mutantes en comparación con los controles BN. También se sugiere que los organismos DN responden de manera tardía, pero las frecuencias de mutantes tanto en Ret como en E tienden a incrementarse durante las 7 semanas de seguimiento.

8.5 Susceptibilidad a daño genético en desnutrición

Numerosos estudios del efecto de la DES a nivel citogenético han sido reportados en humanos y en modelos animales de experimentación, los animales de laboratorio han sido usados para estudios *in vivo* e *in vitro* para el estudio de los efectos de la DES (Ortiz y cols., 2011). Estudios citogenéticos han evidenciado el daño presente en el material genético asociado a DES. Estos estudios han establecido que durante la lactancia, la DES ejerce efectos adversos en algunos tejidos (Cervantes, 2011). Con respecto a esto, Cortés y cols. (2001), utilizando un modelo de DES en rata, demostraron por medio del ensayo cometa que se presentaban altos índices de daño al ADN en bazo, sangre periférica y médula ósea en ratas de 21 días de edad.

Ortiz y cols. (2004), encontraron que en ratas DN tratadas con Mitomicina C, se presentaba una elevada frecuencia de Ret micronucleados y que en comparación con las ratas testigo, el daño en el ADN era evidente. De manera complementaria, mediante citometría de flujo, se demostró que ratas con DES grave, había una frecuencia elevada de micronúcleos en Ret, lo cual es consistente y refleja un importante daño al ADN (Ortiz y cols., 2011).

El presente trabajo apoya y complementa las observaciones anteriores. En este estudio se reportan frecuencias elevadas de Ret-Mut y E-Mut, lo cual sugiere que a nivel génico, la DES se encuentra asociada con un incremento de mutaciones somáticas, tomando como indicador el ensayo *Pig-a*.

Cabe señalar que éste es el primer trabajo que reporta el efecto de la DES grave mediante el ensayo *Pig-a* en un modelo de inducción de DES que abarcó la etapa de lactancia y juventud de las ratas.

En cuanto a la respuesta ante ENU, los grupos de estudio respondieron incrementando las frecuencias de mutantes para ambas estirpes celulares. El grupo DN de 60 mg (dosis alta) presentó mayor frecuencia de mutantes en los análisis de Ret y E, esto demuestra que la DES grave más una dosis alta de ENU, dan como resultado incrementos considerables en las frecuencias de mutantes.

La dosis de 30mg (dosis baja) no mostró diferencias significativas entre los grupos DN y BN, esto sugiere que a dosis bajas, mecanismos de reparación del material genético puedan ser funcionales y contrarrestar el daño inducido por ENU.

Se ha reportado que la rata tiene mayor capacidad para reparar aductos del ADN alquilados, mediante la actividad de la proteína O(6)-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) (Gerson y cols., 1986; Dobo y cols., 2011). Esta proteína es clave en la resistencia de células tumorales (Christmann y cols., 2010).

MGMT, ofrece protección contra la formación de mutaciones de transición como GC → AT inducidas por agentes alquilantes (Lees y cols., 2004), se sugiere que este mecanismo sea el que esté reduciendo los daños inducidos por ENU en dosis de 30mg.

9. Ensayos de mutación génica en estudios de desnutrición

Hasta el momento solo dos genes han sido estudiados en modelos de DES, HPRT y *Pig-a*. Ambos genes se localizan en el cromosoma X, sin embargo se encuentran distantes ya que HPRT se ubica en el brazo largo en la posición 26.1 y *Pig-a* está en el brazo corto en la posición 22. Los ensayos de detección de mutantes basados en estos genes tienen características distintas, en el cuadro **VI** se presentan diferencias así como las ventajas del ensayo *Pig-a* comparado con el ensayo HPRT.

Cuadro VI. Fortalezas y debilidades del ensayo *Pig-a* vs HPRT

Fortalezas	Debilidades
1. Versatil en términos de especies y tipos de células que se pueden ensayar y técnicas de análisis que se pueden aplicar: tanto el flujo y ensayos clonales son posibles.	1. Los análisis de citometría de flujo requieren equipos relativamente costosos y personal capacitado.
2. El Ensayo con citometría de flujo requiere sólo horas para producir un resultado, no es necesario el cultivo de células.	2. El empleo de clones de células T resistentes a ProAER, así como los mitógenos usados para estimular el crecimiento de linfocitos para el ensayo HPRT puede no ser adecuado para el ensayo <i>Pig-a</i> .
3. Las bajas frecuencias de mutantes basales son menores a 5 por millón de células analizadas (en roedores), lo que beneficia a la sensibilidad del ensayo.	3. El ensayo mide la mutación en un único gen cuya sensibilidad a diversos tipos de daño en el ADN no ha sido bien definido.
4. Los ensayos de citometría de flujo en E y Ret sólo requieren un pequeño volumen de sangre, lo que hace que el muestreo se pueda repetir en los roedores.	4. Pocos datos se han generado tomando como marcadores a las proteínas dependientes de GPI para detectar las mutaciones en el gen <i>Pig-a</i> .
5. La repetición de la dosificación con mutágenos dan una respuesta aditiva en los ensayos, por lo que los puntos finales son especialmente adecuados para los protocolos de tratamientos crónicos / subcrónicos.	
6. No se requieren animales transgénicos y se combina con los bajos requisitos de volumen de sangre para el ensayo por citometría de flujo, esto hace que el ensayo se pueda integrar con otras pruebas de toxicología.	
7. El seguimiento de mutantes se puede realizar con los mismos animales.	
8. La mayoría de los reactivos que requiere el ensayo están disponibles comercialmente, recientemente se ha estandarizado un kit estandarizado y protocolos.	
9. Los ensayos han sido positivos en Ret y E, en HPRT no se obtuvieron resultados positivos en los cultivos de linfocitos de organismos desnutridos.	
10. En los linfocitos existen una limitación de la dilución de clonación en los linfocitos para resistencia a ProAER o 6-thioguanina.	

10. Conclusiones

1. El modelo de inducción de DES hasta los 65 días de edad mediante restricción de alimento fue adecuado para los experimentos.
2. Los fenotipos negativos a la proteína dependiente de GPI CD59 fueron detectados mediante citometría de flujo.
3. Las frecuencias espontáneas de mutantes en los grupos DN en comparación con los BN fueron 10 veces más elevadas.
4. Las frecuencias de mutantes en los grupos DN vs BN con dosis de 60mg fueron por lo menos 0.5 veces más que en el grupo BN a partir de la semana 1.
5. Se observaron incrementos en la frecuencia de mutantes con la administración de ENU en ambas dosis de 30 y 60mg en los grupos de estudio.
6. El grupo DN 60mg presentó la mayor frecuencia de Ret-Mut y E-Mut a partir de la semana 2 y hasta la semana 7.
7. El ensayo *Pig-a* es prometedor como ensayo de daño génico en modelos de inducción de DES así como diversas aplicaciones de índole genotóxico y clínico.

11. Perspectivas

1. Analizar si existe una disminución en el porcentaje de los mutantes Ret vs E con base a los porcentajes presentes en las muestras de los individuos sanos administrados y no administrados con ENU.
2. Estudiar los procesos de maduración de mutantes Ret en modelos de DES.
3. Realizar estudios de proliferación celular en para comprobar si existe un desfase en los ciclos celulares de individuos administrados con 30 mg de ENU.

4. Determinar la viabilidad de los Ret y E mutantes presentes en sangre periférica de rata.
5. Observar y evaluar la morfología de Ret y E mediante frotis de sangre periférica.
6. Proponer mecanismos de reparación de ADN que puedan intervenir en la disminución de mutantes *Pig-a*.
7. Evaluar agentes protectores en el modelo de DES expuesto a ENU.

12. REFERENCIAS

- Abramsson-Zetterberg L, Zetterberg G, Berqvist M, Grawe J (2000). Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 36:22-31.
- Ahmed T, Haque R, Mansur A, Ahmed S, Petri W, Cravioto A (2009). Use of metagenomics to understand the genetic basis of malnutrition. *Nutr. Rev.* 67: S201-S206.
- Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L (1999). Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5209–5214.
- Armendares S, Salamanca F, Frenk S (1971). Chromosome abnormalities in severe protein calorie malnutrition. *Nature.* 232:271-273.
- Behrman R, Vaughm V, Nelson W (1986). Tratado de pediatría. 9a.Edición. Editorial Iberoamericana. México. pp. 139-190.

- Benedetti R, Goldman H, Fló J, Massouh E, Roux M (1992). Alterations of B cell precursors in bone marrow of malnourished rats. *Com Biol.* 10:275-281.
- Betancourt M, Hernández G, Cravioto J (1979). Essential aminoacids deficiency and the production of chromosomal anomalies. *Rev Invest Clin.* 31:45-52.
- Betancourt M, Balvanera P, Ortiz R (1986). Frequency of sister chromatid Exchange (SCE) in bone marrow cells of severely malnourished animals during early life. *Mutat Res.* 175:29-31.
- Betancourt M, Ortiz R (1991). Efecto de la desnutrición severa en el nivel citogenético. *Ciencia.* 42:367-373.
- Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L (1995). Assesment of DNA damage by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat Res.* 331:65-77.
- Bessler M, Mason P J, Hillmen P, Miyata T, Yamada N, Takeda J, Luzzatto L, Kinoshita T (1994). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene, *EMBO J.* 13:110–117.
- Bhalli J, Shaddock J, Pearce M, Dobrovolsky V, Cao X, Heflich R, Vohr H (2011) Report on Stage III Pig-a Mutation Assays Using Benzo[a]pyrene. *Environ Mol Mutagen.* 52:731-737.
- Bryce S, Bemis J, Dertinger S (2008). In Vivo Mutation Assay Based on the Endogenous Pig-a Locus. *Environ Mol Mutagen.* 49:256-264.
- Calzada LR (1998). Fundamentos fisiopatológicos. Primera edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana.

- Cravioto J, Vega-Franco L (1995). Historical highlights of mexican contributions to human nutrition. *Arch Med Res.* 26:S133-S137.
- Cervantes E (2011). Efecto de la desnutrición moderada y grave en la estabilidad genómica de niños menores de cinco años. Tesis de Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa México. 129 p.
- Chandra KR (1996). Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad. Sci.* 93:14304-14307.
- Christmann M, Nagel G, Horn S, Krahn U, Wiewrodt D, Sommer C, Kaina B (2010). MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int J Cancer.* 9:2106-18.
- Cortés E (1993). Detección de células resistentes a la 6-tioguanina en médula ósea de ratas desnutridas durante la lactancia. Servicio Social. Licenciatura en Biología Experimental. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa México. 33 p.
- Cortés E (1997). Detección de daño en el ADN por medio de electroforesis unicelular en células de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa México. 82 p.

- Cortés E, González C, Betancourt M, Ortiz R (2001). Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratog Carcinog Mutagen*. 21:231-47.
- Dertinger S, Phonethepswath S, Weller P, Avlasevich S, Torous K, Mereness J, Bryce S, Bemis J, Bell S, Portugal S, Aylott M, MacGregor J (2011). Interlaboratory Pig-a Gene Mutation Assay Trial: studies of 1, 3-Propane Sultone With Immunomagnetic Enrichment of Mutant Erythrocytes. *Environ Mol Mutagen*. 52:748-755.
- Dertinger S, Heflich R (2011). In Vivo Assessment of Pig-a Gene Mutation Recent Developments and Assay Validation. *Environ Mol Mutagen*. 52:681-684.
- Dobo K, Fiedler R, Gunther W, Thiffeault C, Cammerer Z, Coffing S, Shutsky T, Schuler M (2011) Defining EMS and ENU dose–response relationships using the *Pig-a* mutation assay in rats. *Mutation Research*. 725:13– 21.
- Dobrovolsky V, Miura D, Heflich R, Dertinger S (2010). The In Vivo Pig-a Gene Mutation Assay. A Potential Tool For Regulatory Safety Assessment. *Environ Mol Mutagen*. 51:825-835.
- Dobrovolsky VN, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Manjanatha MG, Miura D, Uchikawa M, Mattison DR, Morris SM (2008). Evaluation of *Macaca mulatta* as a model for genotoxicity studies. *Mutat Res*. 673:21–28.
- Frenk S (1989). Adaptación metabólica en la desnutrición. Cuadernos de nutrición. 12:17-32.

- Gerson S, Trey J, Miller K, Berger N (1986) Comparison of O6alkylguanineDNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*. 7:745–749.
- Gómez F (1946). Desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 3:543-551.
- Golden N (2002). The development of concepts of malnutrition. *Am Soc for Nutrit Sci*. 2117S-2122S.
- Goth R, Rajewsky M (1974). Persistence of O6-ethylguanine in rat-brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71: 639-645.
- Griffiths A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart W (2000). An Introduction to Genetic Analysis. Ed. 7^a. New York: W. H. Freeman; p. 475.
- Gronowicz G, Swift H, Steck T (1984). Maturation of the reticulocyte *in vitro*. *J. Cell Sci*. 71:177-197.
- Hayashi M, McGregor J, Gatehouse D, Adler I, Blakey D, Detinger S, Krishna G, Monta T, Russo A, Sutou S (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environ Mol Mutagen*. 35:234-252.
- Hall S, Rosse W (1996). The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 87:5332–5340.
- Hernández P, Almeida J, Orfao A. (2008). Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clin*. 131:617-30.
- Justice M, Noveroske J, Weber J, Zheng B, Bradley A (1999). Mouse ENU mutagenesis. *Hum. Mol. Genet*. 8:1955–1963.

- Karadimitris A, Luzzatto L (2001). The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leukemia*. 15:1148–1152.
- Kaushansky K (2006). Hematopoietic stem cells, progenitors, and cytokines. En: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ (eds.). *Williams Hematology*. 7a. ed. New York: McGraw-Hill. 201-220.
- Krawinkel M (2003). Kwashiorkor is still not fully understood. *Bull WHO*. 81: 910-911.
- Krishna G y Hayashi M (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res*. 455:155-166.
- Lees N, Harrison K, Hall N, Margison G, Povey A (2004). Reduced MGMT activity in human colorectal adenomas is associated with K-ras GC→AT transition mutations in a population exposed to methylating agents. *Carcinogenesis*. 7:1243-1247.
- Loveless A, Hampton C (1969). Inactivation and mutation of coliphage T₂ by N-methyl-N- and N-ethyl-Nitrosourea. *Mutation Res*. 7: 1-12.
- Luzzatto L, Bessler M, Rotoli B (1997). Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell*. 88:1–4.
- Marin M, De Tomás M, Serres C, Mercuri O (1995). Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr*. 125:1017-1024.

- McConville M, Ferguson M (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J.* 294:305-24.
- Medina H (2005). Efecto de la desnutrición y de fármacos sobre la frecuencia y tipo de micronúcleos en eritrocitos de rata. Tesis de Maestría en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa México. 96 p.
- Miura D, Vasily N, Dobrovolsky, Takafumi Kimoto, Yoshinori Kasahara, Robert H. Heflich (2009). Accumulation and persistence of Pig-A mutant peripheral red blood cells following treatment of rats with single and split doses of N-ethyl-N-nitrosourea. *Mutation Research.* 677:86–92.
- Miura D, Dobrovolsky VN, Kasahara Y, Katsuura Y, Heflich RH (2008a). Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: I. Flow cytometric detection of CD59-negative peripheral red blood cells and CD48-negative spleen T cells from the rat. *Environ Mol Mutagen.* 49:614–621.
- Miura D, Dobrovolsky VN, Mittelstaedt RA, Kasahara Y, Katsuura Y, Heflich RH (2008b). Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: II. Selection of Pig-A mutant rat spleen T-cells with proaerolysin and sequencing Pig-A cDNA from the mutants. *Environ Mol Mutagen* 49:622–630.
- Miyata T, Takeda J, Iida J, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, Kinoshita T (1993). The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science.* 259:1318–1320.

- Murthy B, Rahiman A (1994). Chromosomal abnormalities in severely malnourished Indian children. *Hiroshima J. Med. Sci.* 32:291-294.
- Murthy P, Srikantia P (1981). SCE frequency in malnourished mice. *Metabolism.* 30:1-2.
- Murthy P, Bhaskaram P, Srikantia S (1980). Sister chromatid exchanges in protein-energy malnutrition. *Hum Genet.* 55:405-406.
- Mutchinick O, Lisker R, Ruz L, Salamanca F, Armendares S (1979). Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein caloric malnutrition. *Ann. Genet.* 22: 129-132.
- Ney P (2011). Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol.* 18:152–157.
- Ninomiya H, Sims P (1992). The human complement regulatory protein CD59 binds to the alpha-chain of C8 and to the «b» domain of C9. *J Biol Chem.* 267:13675-80.
- Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ (2000). The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm. Genome.* 11:478–483.
- Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. (Editores). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
- Ortiz R (1987). Efecto de la desnutrición sobre las células de médula ósea de rata. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 116 p.

- Ortiz R, Campos C, Gómez J, Espinoza M, Ramos-Bonilla M, Betancourt M (1994). Sister chromatid exchange and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein caloric malnutrition. *Mutat. Res.* 213: 33-37.
- Ortiz R, Cortés E, González C, Pérez P, Betancourt M (1996). Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Med Sci Res.* 24:843-846.
- Ortiz R, Cortés L, González C, López L, Pérez P, Cortés E, Betancourt M (1997). Analysis of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. *Environ Mol Mutagen.* 43:179-185.
- Ortiz R, Cortés E, Pérez L, González C, Rodríguez E, Betancourt M (1999). Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica. *Animales de Experimentación.* 4:35-39.
- Ortiz R, Medina H, Rodríguez L, González-Márquez H, Cortés E (2004). Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environ Mol Mutagen.* 43: 179-185.
- Ortiz R, Rodríguez L, Cortés E, Nájera O, Medina H, González C (2006). Estudios sobre el material genético en desnutrición. Páginas 277-296. Sociedad Mexicana de Genética y Universidad Autónoma del Estado de México. Tópicos de Genética. CEDIMSA. Primera edición. México. D.F.

- Ortiz R, Medina H, Cortés E, Cervantes E, Rodríguez L (2011). Trimethoprim-Sulfamethoxazole Increase Micronuclei Formation in Peripheral Blood From Weanling Well-Nourished and Malnourished Rats. *Environ Mol Mutagen.* 52:673-680.
- Parra L, Reyes TG, Escobar B (2003). La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. *Rev Fac Med UNAM.* 46:32-36.
- Pegg A, Wiest L, Foote R, Mitra S, Perry W (1983). Purification and properties of O6-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 258: 2327-2333.
- Pelletier D, Frongillo E, Habicht J (1993). Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. *Am. J. Public. Health.*83:1130-1133.
- Peruzzi B, Araten D, Notaro R, Luzzatto L (2010).The use of PIG-A as a sentinel gene for the study of the somatic mutation rate and of mutagenic agents in vivo. *Mutation Research.* 705:3-10.
- Pfuhler S, Kirkland D, Kasper P, Hayashi M, Vanparys P, Carmichael P, Dertinger S, Eastmond D, Elhajouji A, Krul C, Rothfuss A, Schoening G, Smith A, Speit G, Thomas C, van Benthem J, Corvi R (2009). Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities—Report from an ECVAM workshop. *Mutat Res.* 680:31–42.
- Phonethepswath S, Bryce S, Bemis J, Dertinger S (2008). Erythrocyte based Pig-a gene mutation assay: Demonstration of cross species potential. *Mutation Research.* 657:122–126.

- Phonethepswath S, Franklin D, Torous D, Bryce M, Bemis J, Raja S, Avlasevich S, Weller P, Hyrien O, Palis J, MacGregor J and Dertinger S (2010). Pig-a Mutation: Kinetics in Rat Erythrocytes Following Exposure to Five Prototypical Mutagens. *Tox Scien.* 114:59–70.
- Resnick O, Morgane P, Asno R, Millar M (1982). Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neuroscience and Biobehavioral Rev.* 6: 55-75.
- Rodríguez L, Cervantes E, Ortiz R (2011). Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: A public health problem. *Int J Environ Res Public Health.* 8:1174–1205.
- Romero E (2005). Desnutrición proteínico-energética. *Nutrición Pediátrica. Sistema de actualización médica en nutrición pediátrica.* 1ª edición. México. Intersistemas. pp. 125-150.
- Rosse W (1997). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine (Baltimore).* 76:63-93.
- Rosti V (2000). The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica.* 85:82–87.
- Sauerwein R, Mulder J, Mulder L, Lowe B, Peshu N (1997). Inflammatory mediators in children with protein energy malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 65:1534-1539.
- Shibuya T, Morimoto K (1993). A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat. Res.* 297:3–38.

- Singer B, Dosanjh M (1990). Site-directed mutagenesis for quantitation of base-base interactions at defined sites. *Mutation Res.* 233: 45-51.
- Singer B, Spengler S, Bod W (1981). Tissue-dependent enzyme-mediated repair or removal of O-ethyl pyrimidines and ethyl purines in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis.* 2:1069-1073.
- Sugita Y, Mazda T, Tomita M (1989). Amino-terminal amino acid sequence and chemical and functional properties of a membrane attack complex-inhibitory factor from human erythrocyte membranes. *J Biochem.* 106:589-92.
- Takahashi M, Takeda J, Hirose S, Hyman R, Inoue N, Miyata T (1993). Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med.* 177:517-21.
- Tomita M (1999). Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta.* 1455:269-86.
- van Zeeland A, de Groot A, Neuhauser-Klaus A (1990). DNA adduct formation in mouse testis by ethylating agents: a comparison with germ-cell mutagenesis. *Mutation Res.* 231: 55-62.
- Vega L (1999). Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteico-energética. *Salud Púb de Méx.* 41:328-333.
- Vogt R, Whitfield W, Henderson O, Hannon H (2000). Fluorescence Intensity Calibration for Immunophenotyping by Flow Cytometry. *Methods.* 21: 289-296.
- Wiczling P, Krzyzanski W (2008). Flow cytometric assessment of homeostatic aging of reticulocytes in rats. *Exp. Hematol.* 36:119-127.

- Widdowson E, McCance R (1975). A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res.* 9:154-156.
- Wilcox LA, Ezzell JL, Bernshaw NJ, Parker CJ (1991). Molecular basis of the enhanced susceptibility of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to hemolysis in acidified serum. *Blood.* 78:820–829.
- Young NS (2002). Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med.* 136:534–536.
- Zielenska M, Beranek D, Guttenplan J (1988). Different mutational profiles induced by N-nitroso-N-ethylurea: effects of dose and error-prone DNA repair and correlations with DNA adducts. *Environ. Mol. Mutagen.* 11: 473-485.