



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

***“Efecto genotóxico y mutagénico de la desnutrición moderada y
grave en reticulocitos y eritrocitos de rata”***

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en B.E. Mercedes Monserrat Pacheco Martínez

Comité Tutorial:

Director

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

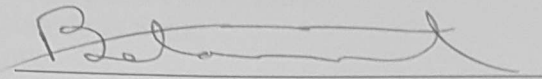
Asesores

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Dra. Elsa Cervantes Ríos

27 de Julio del 2016

El Jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobó la tesis titulada "**Efecto genotóxico y mutagénico de la desnutrición moderada y grave en reticulocitos y eritrocitos de rata**", el día 27 de Julio del año 2016.



PRESIDENTE

Dr. Miguel Betancourt Rule

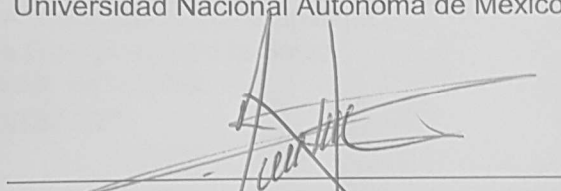
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



SECRETARIA

Dra. María del Carmen García Rodríguez

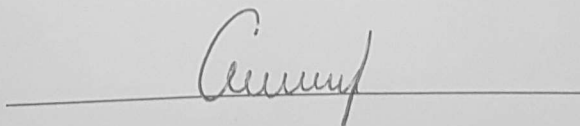
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza
Universidad Nacional Autónoma de México



VOCAL

Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana

Facultad de Agrobiología
Universidad Autónoma de Tlaxcala



VOCAL

Dra. Elsa Cervantes Ríos

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología celular y Citometría de flujo del departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

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

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología los apoyos otorgados por medio de la beca para la realización de estudios de posgrado nivel doctorado con número 248814 y la beca mixta para realización de estancia de investigación en el extranjero.

El Jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobó la tesis titulada “**Efecto genotóxico y mutagénico de la desnutrición moderada y grave en reticulocitos y eritrocitos de rata**”, el día 27 de Julio del año 2016.

PRESIDENTE

Dr. Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

SECRETARIA

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza
Universidad Nacional Autónoma de México

VOCAL

Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana

Facultad de Agrobiología
Universidad Autónoma de Tlaxcala

VOCAL

Dra. Elsa Cervantes Ríos

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

COMITÉ TUTORAL

Directora:

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

Asesora externa:

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM

UMIEZ, Campo II

maricar_67@yahoo.com

Asesores interna:

Dra. Elsa Cervantes Ríos

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

elsi_cervantes@hotmail.com

Dedico este trabajo a:

Mi familia por darme los mejores cimientos para mi desarrollo, todos y cada uno de ustedes han destinado su tiempo para escucharme y darme los mejores consejos, los amo y les agradezco hoy y siempre toda la confianza y los ánimos que han depositado en mí, los cuales me fortalecieron para no dejarme vencer por nada ni nadie.

A habibi por todo tu apoyo y comprensión, por ser paciente, "amí tumake valobashí- 'ana 'ahabbuk".

Agradecimientos a:

La Dra. Rocío Ortiz Muñiz por estos años de enseñanza y por contribuir a mi formación, mi más sincero agradecimiento por todo su apoyo y entusiasmo en todo momento, gracias por guiarme y ser líder de este proyecto.

A los miembros del Laboratorio de Biología celular y Citometría de flujo por el tiempo compartido.

A los miembros del bioterio de la UAM-I por considerarme y ayudarme en todo el proyecto.

Al señor Adolfo Pastelín por todo su apoyo, paciencia y colaboración.

A los doctores miembros del Jurado y Comité tutorial por sus valiosos comentarios y sugerencias, gracias por sus aportaciones, con su apoyo fue posible culminar este trabajo.

Al Posgrado en Biología Experimental por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente para representar a México en eventos y colaboraciones internacionales.

A los Drs. Javed Bhalli, Vasíly Dobrovolsky, Javier Revollo, Haixia Lin y Robert Heflich por todo su apoyo, consejos y colaboración, para ustedes mi reconocimiento y admiración, gracias por enseñarme e impulsarme desde el primer día.

Resumen

La DN es un padecimiento que daña las funciones celulares de manera progresiva en el organismo. Es la causa del 45 % de las muertes en los niños menores de 5 años de edad, y aunque se han estudiado ampliamente sus efectos a nivel citogenético, a nivel génico no se cuenta con suficientes reportes que muestren si es posible relacionar el grado de DN con la susceptibilidad génica.

En el manejo clínico de la DN, los antibióticos forman parte de la mayoría de los protocolos, no obstante, existe poco análisis de los efectos del actual método de tratamiento en los que se emplean diferentes antibióticos de rutina como la TMP-SMX.

En este trabajo se evaluaron los efectos genotóxico y mutagénico del DN2° y del DN3° con la combinación de los ensayos de MN y *Pig-a* para determinar el daño al ADN en RET y E de ratas BN y con DN2° ó DN3° expuestas y no expuestas a ENU ó a TMP-SMX. Ratas de la cepa Wistar fueron evaluadas por 63 días después de la exposición a ENU y 45 días después de ser tratadas con TMP-SMX donde se monitorearon los porcentajes de MN y las frecuencias de mutantes *Pig-a*.

Los resultados muestran que la DN2° y la DN3° se relacionan con un efecto genotóxico y mutagénico al incrementar el porcentaje de MN y la frecuencia de mutantes *Pig-a*. Los animales expuestos al ENU presentaron incrementos dosis y tiempo dependientes. Al comparar los efectos inducidos entre estos grupos se observó que no hubo diferencias significativas entre los animales BN y con DN2°. Por otra parte, se encontró un efecto mutagénico persistente con la dosis de

100/500 mg TPM-SMX y DN3°. El DN3° tiene mayor efecto genotóxico en comparación con el efecto producido por la DN2°. No se observaron diferencias en el efecto mutagénico relacionado con el grado de DN. De acuerdo a los resultados obtenidos, es necesario continuar con estudios complementarios en ambos grados de DN que fortalezcan los hallazgos obtenidos en este estudio.

Abstract

UN is a condition that damages the cellular functions of the body progressive way. Is the cause of 45% of global deaths in children under 5 years of age; It has been widely studied the effects at cytogenetic level, however for gene level not have enough reports to show if it is possible to relate the UN degree and susceptibility gene.

In managing the UN, antibiotics are part of most protocols, however, there is not enough analysis regarding the evidence behind the current treatment method of different routine antibiotics such as TMP-SMX.

In this report, genotoxic and mutagenic effects of UN2° and UN3° were evaluated with the combination of MN and *Pig-a* assays to determine DNA damage in RET and RBC in WN rats and UN rats with UN2° or UN3° exposed and not exposed to ENU and TMP-SMX. Wistar rats were evaluated for 65 days after ENU exposed and 45 days after treatment with TMP-SMX, MN index and *Pig-a* mutant frequencies were monitored.

Results show that UN2° and UN3° are relate to genotoxic and mutagenic effect by increasing the MN index and *Pig-a* mutant frequency. Animals exposed to mutagen, showed dose-dependent increases for ENU, there were not significant differences between UN2° and WN rats. A persistent mutagenic effect was found with the doses 100/500 mg TPM-SMX and UN3°. The UN3° has high genotoxic effect compared to the effect produced by the UN2°. We did not find differences between mutagenic effect related to UN degree. According to the results, it is

necessary to continue with complementary studies in order to evaluate both UN degrees to strengthen the findings found in this study.

Índice

Resumen.....	v
Resumen en inglés (<i>Abstract</i>).....	vi
Abreviaturas.....	1
Índice de Figuras.....	2
Índice de Cuadros.....	2
Índice de Gráficas.....	3
1. Introducción.....	4
1.1 Desnutrición.....	4
1.1.1 Clasificación de la desnutrición.....	6
1.1.2 Desnutrición moderada.....	6
1.1.3 Desnutrición grave.....	7
1.1.4 Epidemiología.....	8
1.1.5 Modelos experimentales para inducción experimental de la desnutrición....	9
1.2 Estudios citogenéticos y de desnutrición.....	10
1.3 Ensayo de Micronúcleos (MN)	11
1.3.1 Clasificación de MN.....	12
1.3.2 Porcentajes de MN en estudios de la desnutrición.....	13
1.4 Estudio a nivel génico: ensayo de mutación somática en el gen (<i>Pig-a</i>).....	14
1.4.1 Proteína CD59.....	16
1.4.2 Principio del ensayo <i>Pig-a</i>	17
1.5 Mutaciones génicas.....	19
1.5.1 N-etil-N-nitrosourea (ENU).....	19

1.6	Uso de antibióticos en el manejo de la desnutrición.....	22
1.6.1	Trimetoprima y sulfametoxazol (TMP-SMX).....	22
2.	Antecedentes.....	24
2.1	Estudios citogenéticos y génicos de la desnutrición.....	24
2.2	Eritropoyesis.....	25
3.	Planteamiento del problema y pregunta de Investigación.....	28
4.	Justificación.....	29
5.	Hipótesis.....	30
6.	Objetivos.....	30
7.	Método.....	31
7.1	Inducción de desnutrición experimental post-natal.....	31
7.2	Desnutrición experimental post-destete.....	33
7.3	Administración de ENU.....	33
7.3.1	Toma de muestra de sangre periférica.....	34
7.4	Administración de TMP-SMX.....	34
7.4.1	Toma de muestra de sangre periférica.....	35
7.5	Obtención y fijación de la muestra para ensayo de MN.....	36
7.6	Marcaje y procesamiento de muestras.....	36
7.7	Análisis por citometría de flujo.....	37
7.8	Selección de la región de análisis.....	37
7.9	Tinción diferencial de diferentes poblaciones de eritrocitos.....	38
7.10	Detección de la mutación Pig-a (marcaje de las muestras).....	39
7.11	Análisis por Citometría de Flujo.....	40

7.12 Selección de la región de análisis.....	40
7.13 Muestra de calibración (muestra pseudomutante).....	41
7.14 Análisis estadístico de los resultados.....	42
8. Resultados.....	43
8.1 DN2°: peso corporal.....	43
8.2 Efectos de la DN2°.....	45
8.2.1 Efecto genotóxico.....	45
8.2.1.1 Porcentaje de RET-MN.....	45
8.2.1.2 Porcentaje de E-MN.....	47
8.2.1.3 Porcentaje de RET.....	48
8.2.3 Efecto mutagénico.....	49
8.2.3.1 Frecuencia de RET mutantes (RETCD59-).....	49
8.2.3.2 Frecuencia de E mutantes (ECD59-).....	50
8.2.3.3 Porcentaje de RET.....	52
8.3 Efectos de la DN3°.....	53
8.3.1 DN3°: peso corporal.....	53
8.3.2 Efecto genotóxico.....	55
8.3.2.1 Porcentaje de RET-MN.....	55
8.3.2.2 Porcentaje de E-MN.....	57
8.3.2.3 Porcentaje de RET.....	58
8.3.3 Efecto mutagénico.....	60
8.3.3.1 Frecuencia de RET mutantes (RETCD59-).....	60
8.3.3.2 Frecuencia de E mutantes (ECD59-).....	61

8.3.3.3 Porcentaje RET.....	62
8.4 Comparación de los porcentajes y las frecuencias basales acumuladas de ratas testigo, DN2° y DN3°	64
9. Discusión.....	66
9.1 Modelo de inducción de desnutrición.....	66
9.2 Efecto genotóxico y mutagénico de la DN2°	68
9.2.1 Efecto genotóxico.....	68
9.2.2. Efecto mutagénico.....	68
9.3 Efecto genotóxico y mutagénico de la DN3°	73
9.3.1 Efecto genotóxico.....	73
9.3.2. Efecto mutagénico.....	74
9.4 Susceptibilidad a daño genético en desnutrición.....	75
9.5 Ensayos de mutación génica en estudios de desnutrición.....	76
10. Conclusiones.....	79
11. Perspectivas.....	81
12. Referencias Bibliográficas.....	82
13. Publicaciones generadas en este trabajo.....	99
13.1 Publicaciones generadas de la estancia de Investigación.....	99

Índice de Abreviaturas

- AC: Aberraciones Cromosómicas
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ARN: Ácido Ribonucleico
BBS: Solución amortiguadora de bicarbonato
DCP: Desnutrición calórico-proteínica
DN: Desnutrición
DN1°: Desnutrición leve
DN2°: Desnutrición moderada
DN3°: Desnutrición grave
DE: Días de edad
ENU: N-etil-N-nitroso urea
E: Eritrocitos maduros
E-MN: Eritrocitos con micronúcleo
E^{CD59-}: Eritrocitos mutantes
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FM: Frecuencia de mutaciones
FMs: Frecuencias de mutación
GPI: Glucosilfosfatidilinositol
HPRT: Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
ICH: Intercambio de cromátidas hermanas
IP: Yoduro de propidio
MN: Micronúcleos
PBS: Amortiguador de fosfatos
PE: Ficoeritrina
Pig-a: Gen glucosilfosfatidilinositol de clase A en roedores
PIG-A: Gen glucosilfosfatidilinositol de clase A en humanos
RET: Reticulocitos
RET-MN: Reticulocitos con micronúcleo
RET^{CD59-}: Reticulocitos mutantes
TMP-SMX: Trimetoprima y sulfametoxazol

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de la molécula GPI.....	15
Figura 2. Célula normal y célula mutante <i>Pig-a</i>	18
Figura 3. Eritropoyesis normal y formación de mutantes <i>Pig-a</i> en sangre Periférica de rata	27
Figura 4. Estrategia de selección de las regiones para el análisis de los MN.....	38
Figura 5. Selección y tinción diferencial de poblaciones con MN.....	39
Figura 6. Estrategia de selección de las regiones de análisis de mutantes <i>Pig-a</i>	41
Figura 7. Instrumento de calibración.....	42

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Aductos del ADN después de la exposición a ENU.....	21
Cuadro 2. Grupos de estudio de ratas BN y con DN2° expuestos a ENU.....	34
Cuadro 3. Grupos de estudio de ratas BN y con DN3° tratados con TMP-SMX...35	
Cuadro 4. Peso de las ratas BN y DN2° expuestas y no expuestas a ENU.....	44
Cuadro 5. Peso de las ratas BN y DN3° expuestas y no expuestas a TMP-SMX.54	

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de RET-MN en sangre periférica de ratas BN y con DN2° expuestas y no expuestas a dos dosis de ENU.....	46
Gráfica 2. Porcentaje de E-MN en sangre periférica de ratas BN y con DN2° expuestas y no expuestas a dos dosis de ENU.....	47
Gráfica 3. Porcentaje de RET en sangre periférica de ratas BN y con DN2° expuestas y no expuestas a dos dosis de ENU.....	48
Gráfica 4. Frecuencia de RET ^{CD59-} en ratas DN2° y BN testigo y expuestas a ENU.....	50
Gráfica 5. Frecuencia de E ^{CD59-} en ratas DN2° y BN testigo y expuestas a ENU.....	51
Gráfica 6. Porcentaje RET en las ratas con DN2° y BN expuestas a ENU con base al testigo.....	52
Gráfica 7. Porcentaje RET-MN en sangre periférica de ratas BN y con DN 3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX.....	56
Gráfica 8 Porcentaje de E-MN en sangre periférica de ratas BN y con DN 3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX.....	57
Gráfica 9. Porcentaje de RET en sangre periférica de ratas BN y con DN 3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX.....	59
Gráfica 10. Frecuencia de RET ^{CD59-} en sangre periférica de ratas BN y con DN 3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX.....	61
Gráfica 11. Frecuencia de E ^{CD59-} en sangre periférica de ratas BN y con DN 3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX.....	62
Gráfica 12. Porcentaje de RET en sangre periférica de ratas BN expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX.....	63
Gráfica 13. Porcentajes basales de ensayo de MN en sangre periférica de ratas con DN2° y DN3°.....	65
Gráfica 14. Frecuencias basales de ensayo <i>Pig-a</i> en sangre periférica de ratas con DN2° y DN3°.....	66

1. Introducción

1.1 Desnutrición

La DN es un problema de salud pública que afecta principalmente a la población menor de 5 años; se presenta como un síndrome nutricional caracterizado por la asimilación deficiente de alimentos. La DN es considerada como un estado multifactorial donde predomina el déficit energético y proteico, resultado del desbalance negativo de la cantidad y calidad de macro y micronutrientes necesarios para proveer energía suficiente al organismo para su desarrollo apropiado (Gómez, 1946; Rodríguez et al., 2011; Kumar et al., 2015).

La deficiencia de macronutrientes como las proteínas, carbohidratos y lípidos, provoca DCP y combinada con la deficiencia de micronutrientes útiles para la síntesis de enzimas y de proteínas, altera la formación de sustratos necesarios para la biotransformación e inactivación de sustancias tóxicas para el organismo lo que representa un problema nutricional que afecta a millones de mujeres embarazadas, ancianos y niños (González-Mendoza et al., 2002; Rodríguez et al., 2011). Por ejemplo, deficiencias de micronutrientes como el hierro, yodo, folato y ácido fólico, vitamina A y Zinc son las más comunes y propician estadios pobres de crecimiento y madurez biológica e incrementan el riesgo de morbilidad y mortalidad (Bailey et al., 2015). La deficiencia en hierro desencadena anemia microcítica, altera el sistema inmune y endócrino (Lozoff et al., 2013), mientras que, la deficiencia de yodo puede afectar la función de la glándula tiroides (Bailey et al., 2015). El zinc está implicado en múltiples aspectos del metabolismo celular (es necesario para la actividad de más de 200 enzimas), además de que juega un

papel crítico para la función del sistema inmunológico, la división celular y la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Bailey et al., 2015).

El folato es un término genérico para varias formas de la vitamina B. El folato se encuentra naturalmente en los alimentos, mientras que el ácido fólico es una forma sintética de la vitamina que se utiliza en los alimentos enriquecidos y en suplementos dietéticos. El ácido fólico es esencial para la síntesis de purinas y timidilato y, por lo tanto, está implicado en la síntesis, la estabilidad, y la reparación del ADN (McLean et al., 2008; Bailey et al., 2015). Por su parte, la deficiencia de vitamina A ha sido asociada con un aumento en el riesgo y la severidad de las infecciones, además de ser una de las causas principales de morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo mundo (Bailey et al., 2015).

La DN es un padecimiento que daña las funciones celulares de manera progresiva, afecta 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 (Calzada, 1998).

Los estudios sobre DN en humanos son indispensables, sin embargo, hay protocolos que bioéticamente no pueden ser implementados en humanos (Ortiz et al., 2011), especialmente cuando se trata de mutágenos y fármacos de los cuales no se tiene suficiente información de su potencial efecto genotóxico y mutagénico. Por este motivo, se proponen modelos de estudio empleando animales de experimentación, donde además de poder controlar diversas variables, se pueden evaluar los posibles efectos de daño al ADN.

1.1.1 Clasificación de la desnutrición

Gómez (1946) hizo una descripción de la DN y con base en diferentes indicadores como el déficit de peso, de talla y la relación peso/talla con respecto a lo esperado para la edad cronológica del organismo, la clasificó en tres grados:

- Desnutrición de primer grado o leve (DN1°): déficit de peso entre el 10 y 24%.
- Desnutrición de segundo grado o moderada (DN2°): déficit de peso entre el 25 y 39%.
- Desnutrición de tercer grado o grave (DN3°): déficit de peso mayor al 40%.

En el DN3° el organismo ha agotado en gran medida las reservas para su sobrevivencia y este tipo de DN también es llamada DCP (Cravioto y Vega-Franco, 1995; Ortiz et al., 1999).

1.1.2 Desnutrición moderada

El DN2° afecta al 11 % de los niños menores de 5 años de edad en todo el mundo. Los niños con DN2° tienen 3 veces mayor probabilidad de riesgo de muerte y enfrentan un mayor riesgo de morbilidad de enfermedades infecciosas así como retraso físico y dificultades en el desarrollo cognitivo en comparación con los niños bien nutridos (Black et al., 2008; Chang et al., 2013). En este grado de DN, se acentúa gradualmente la pérdida de peso. Por lo que puede pasar fácilmente a DN3°. Los niños con DN2° presentan hundimiento en los ojos y pérdida de masa muscular, sus tejidos pierden turgencia y elasticidad; se presentan trastornos diarreicos y edemas por hipoproteinemia. La atención médica deberá centrarse en medidas dietéticas y terapéuticas con estricta vigilancia, ya que si el niño no es

atendido de manera adecuada puede desarrollar intolerancia a toda clase y cantidad de alimentos que le sean dados (Gómez et al., 2003).

La DN2° tiene mayor prevalencia que la DN3° (Pelletier et al., 1994; Nájera et al., 2001) y afecta el estado inmunológico. Se ha reportado que en este grado de DN existe una reducción significativa en la expresión de marcadores de activación de linfocitos y por consiguiente se presenta una menor capacidad de activación de los linfocitos T (Rodríguez et al., 2005; Cortés et al., 2008). Se han reportado otras alteraciones en el ciclo celular en células de bazo de ratas con DN2°, en donde se ha observado que las proporciones de células en fases S y G₂/M están reducidas, hay un acortamiento de G₁ y un aumento de la fase S, por lo que este grado de DN además de aumentar el tiempo de la fase de síntesis del ADN, aumenta el tiempo total del ciclo celular (Cortés et al., 2013).

1.1.4 Desnutrición grave

Se estima que anualmente, este grado de DN se presenta en el 35% de las 7.5 millones de muertes en niños menores de 5 años (Black et al., 2008; Chang et al., 2013). El DN3° a su vez, tiene dos manifestaciones clínicas: el marasmo y el kwashiorkor (Gómez, 1946; Golden, 2002). El marasmo generalmente se presenta en los lactantes de entre seis y 18 meses de edad (Casanueva et al., 2008) 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 et al., 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 et al., 1986; Frenk, 1989; Golden, 2002). Se caracteriza por edema en abdomen y extremidades (Sauerwein et al., 1997; Krawinkel, 2003) además de la presencia de otros síntomas como: cambio en el color del cabello el cual se cae con facilidad al tocarlo, piel deshidratada y descamación (Sauerwein et al., 1997; Vega, 1999).

Se ha descrito una forma mixta de DN3° denotada como marasmo-kwashiorkor ó Kwashiorkor marasmático donde se manifiesta una combinación de las características clínicas previamente mencionadas. Afecta principalmente a niños de un año de edad, el niño presenta edema, desmedro y emaciación. Puede haber también adelgazamiento del pelo y cambios en la piel, que van acompañadas de infecciones recurrentes (respiratorias y gastrointestinales), que se harán más graves entre mayor sea la pérdida de peso. Este es el padecimiento más crónico y grave (Werner & Bower, 1984; Torun et al., 2002; Rodríguez et al., 2011).

La magnitud del problema de la DN3° varía de un país a otro y en las diferentes áreas geográficas de un mismo país.

1.1.5 Epidemiología

La DN es la causa del 45 % de las muertes globales en niños menores de 5 años de edad. En México entre 1988 y 2012, las prevalencias de los tres grados de DN han tenido disminuciones notables (Rivera et al., 2009). Sin embargo, la DN3°, sigue siendo elevada con 13.6% lo que representa cerca de 1.5 millones de niños menores de 5 años con este padecimiento (ENSANUT, 2012).

En términos generales, la prevalencia de DN3° entre las regiones norte, centro, sur, la Ciudad de México, zonas urbanas y rurales ha sido reportada como heterogénea. Las prevalencias en la población rural en el ámbito nacional se han mantenido al doble que en las de zonas urbanas, y han disminuido con mayor velocidad en las regiones norte y centro comparadas con la región sur, donde se sigue presentando un porcentaje elevado con 27.5% (ENSANUT, 2012).

1.1.6 Modelos experimentales para la inducción experimental de desnutrición

Desde hace algunas décadas, se ha mostrado interés por estudiar los efectos causados por la DN y las posibles secuelas en la salud y el desarrollo posterior del organismo (Chandra, 1996; Ortiz et al., 2006). Los estudios sobre DN 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 y se pueden realizar análisis de susceptibilidad génica, por ejemplo, valorar el tratamiento con fármacos (Cortés, 1997).

Dentro de los estudios realizados sobre DN, los modelos animales han sido ampliamente utilizados desarrollándose principalmente en rata y ratón (Ortiz et al., 1999). Si bien los estudios de sus efectos 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).

Se han empleado básicamente dos métodos para inducir DN experimental en animales de laboratorio durante la lactancia (Ortiz et al., 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 et al., 1982; Marin et al., 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 et al., 1992; Ortiz et al., 1996).

Los estudios particularmente realizados en rata, han aportado información valiosa con relación a las posibles secuelas producidas 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 posible efecto sobre la funcionalidad celular (Ortiz et al., 1996).

1.2 Estudios citogenéticos y desnutrición

Diversos grupos de investigación han trabajado durante años con el objetivo de establecer y reportar los daños y efectos producidos por la DN a niveles citogenético y celular (Betancourt y Ortiz, 1991). Los primeros reportes de estudios citogenéticos se realizaron empleando AC en linfocitos provenientes de niños con DCP, donde se demostró que los organismos desnutridos presentan mayor frecuencia de AC (Betancourt y Ortiz, 1991). Posteriormente se evaluaron ICH en

cultivos de linfocitos. Si bien, algunos grupos no encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y los testigos, otros grupos de estudio reportaron diferencias significativas en las frecuencias de ICH de los organismos desnutridos al ser comparados con los bien nutridos (Murthy et al., 1980; Ortiz et al., 1994).

Los ensayos cometa y de MN han sido de gran utilidad y han aportado valiosa información para el entendimiento de los efectos de la DN. Se ha observado que la DN causa daño al ADN, mismo que puede estar asociado con la presencia de infecciones y tratamientos farmacológicos a los que se someten los niños que presentan DN (Betancourt et al., 1995; Ortiz et al., 1997).

En otro estudio realizado en RET de sangre periférica de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, se observó que la frecuencia de MN es mayor en las células de ratas desnutridas con relación a la observada en las células de ratas bien nutridas. Estos estudios indican que la DN produce daño celular *in vivo* y este daño puede producir efectos negativos para el desarrollo del organismo (Ortiz et al., 2004).

1.3 Ensayo de micronúcleos (MN)

El ensayo de MN es un método de medición de inestabilidad génica, también evalúa genotoxicidad de sustancias, exposición aguda y crónica y es una prueba de rutina para identificar agentes cancerígenos (Murli, 2003; Abrevaya et al., 2007).

La formación de los MN o cuerpos de Howell-Jolly ocurre durante la división celular, son estructuras que resultan de rupturas de cromosomas por pérdida de

los centrómeros (fragmentos acéntricos), o por la pérdida de cromosomas completos. En ambos casos, los MN son incapaces de desplazarse con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico, a los polos del núcleo celular durante la anafase de la división celular (Dertinger et al., 2000; Fenech, 2000; Murli, 2003). Los MN son envueltos por la membrana celular en la telofase, posteriormente asumen la morfología de un núcleo con la excepción de ser más pequeños que el núcleo de la célula (Dertinger et al., 2000; Fenech, 2000).

1.3.1 Clasificación de MN

Los MN pueden ser clasificados con base a su origen, si son generados por el rompimiento de la cadena de ADN por la acción de agentes clastogénicos (clastogenicidad), o por una disfunción del huso mitótico durante la división celular como resultado de la exposición a agentes aneugénicos (aneugenicidad) (Dertinger et al., 2002; Torous et al., 2003). Si se trata de un agente clastogénico, entonces se va originar un MN compuesto de fragmentos cromosómicos debido a: 1) ruptura directa del ADN, 2) replicación sobre un molde de ADN dañado y 3) inhibición de síntesis de ADN (Albertini et al., 2000; Fenech, 2000).

Cuando son agentes aneugénicos, el MN se conformará de al menos un cromosoma completo o una cromátida, este se origina por alteraciones en: el huso mitótico, el cinetocoro, el centriolo o el centrosoma (Vanparys et al., 1990; Sullivan et al., 2001; Goshima et al., 2003).

El ensayo de MN ha sido reportado en diferentes tipos celulares como son: células germinales, hepatocitos, linfocitos, células de bazo, exfoliados de células

obtenidos de mucosa bucal y bronquios, entre otros. Actualmente para realizar el ensayo de MN en rata, a partir de médula ósea o sangre periférica, los RET son el principal tipo celular (Hayashi et al., 2000; Medina, 2005). La prueba de MN con citometría de flujo es apropiada para estudiar especies que presentan frecuencias basales bajas de RET con MN basales y frecuencias bajas de MN y al permitir realizarla en sangre favorece el uso y seguimiento del mismo animal evitando el sacrificio del mismo para la obtención de la médula ósea (Dertinger et al., 2011a). Esto confiere al ensayo de MN, versatilidad para su aplicación y complementariedad con otras pruebas a nivel génico.

1.3.2 Porcentajes de MN en estudios de desnutrición

Se ha reportado que el porcentaje de MN en linfocitos de niños con DN es mayor comparada con la de los niños bien nutridos (Cervantes et al., 2011). Estudios posteriores evaluaron los porcentajes de MN en RET de sangre periférica de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, donde se observó que este indicador de genotoxicidad es alto en las células de ratas desnutridas con relación a la observada en las células de ratas bien nutridas. Estos estudios revelaron que la DN produce daño celular *in vivo* y este daño puede producir efectos negativos para el desarrollo del organismo (Ortiz et al., 2004).

Se ha reportado que la población de RET en ratas de 21 días de edad con DN3°, disminuye respecto al grupo de ratas bien nutridas y que a su vez, aumenta la frecuencia de RET con MN, en cuanto a los porcentajes de E con MN se reportó mayor frecuencia de éstos en los grupos desnutridos en comparación a los

testigos, demostrando así, que en los organismos con DN3° se incrementa la susceptibilidad a daño cromosómico (Medina, 2005).

1.4 Estudio a nivel génico: ensayo de mutación somática en el gen (Pig-a)

La detección de mutaciones somáticas usando al gen “fosfatidilinositol glicano de clase A” (*PIG-A* en humanos y *Pig-a* en roedores) se ha propuesto como prueba de rutina para evaluar el potencial mutagénico de agentes químicos. También se ha sugerido que puede ser útil para el estudio de poblaciones humanas expuestas a contaminantes ambientales y en animales de experimentación así como para determinar el riesgo de desarrollar cáncer (Hernández et al., 2008; Dobrovolsky et al., 2010; Peruzzi et al., 2010; Dertinger et al., 2011b).

Pig-a se localiza en el brazo corto del cromosoma X, y codifica para la subunidad catalítica de la enzima 1-6-N-acetilglucosaminiltransferasa que participa en la primera etapa de la biosíntesis de la molécula de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Takahaski et al. 1993, Rosee 1997, Tomita 1999, Phonethepswath et al., 2008). En la síntesis de esta ancla participan alrededor de 20 genes diferentes (Kinoshita et al., 1997; Ferguson, 1999), de los cuales *Pig-a* es el único que se encuentra en el cromosoma X. El gen contiene 6 exones y 5 intrones, el exón 2 es el más grande y en él ocurren la mayoría de las mutaciones, las cuales en general consisten en la inserción de una señal de paro prematura en las instrucciones para sintetizar el GPI, originando una proteína anormalmente pequeña y no funcional (Brodsky, 2008; Genetics Home Reference, 2013).

La molécula de GPI es esencial para el anclaje de una gran variedad de proteínas de la membrana citoplasmática; consta de una molécula de fosfatidilinositol, un núcleo glucano formado por una molécula de N-glucosamina y 3 manosas, y una molécula de fosfoetanolamina (**Figura 1**) (Phonethepswath et al., 2008; Hernández et al., 2008; Pacheco et al., 2014).

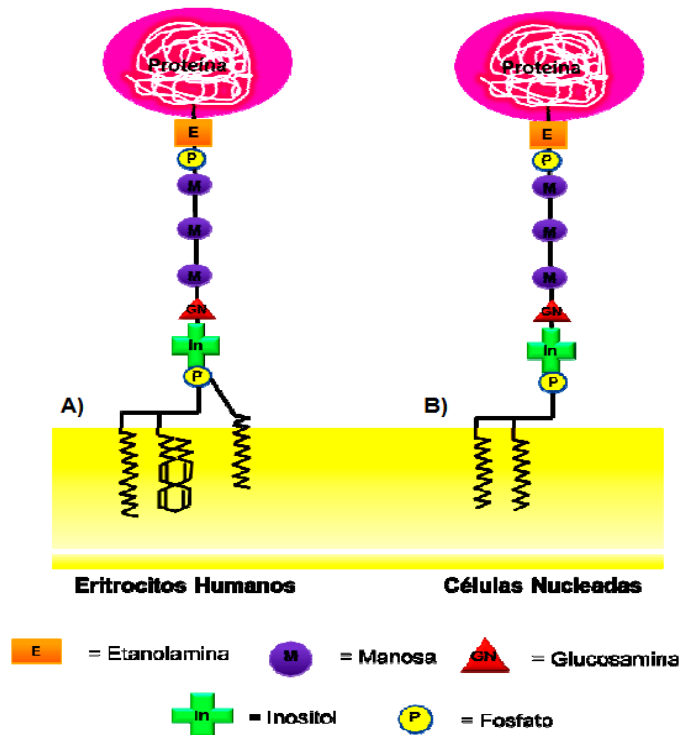


Figura 1. Estructura de la molécula GPI. La estructura básica consiste de: fosfatidil inositol (In) unido a tres (a) o a dos colas de ácidos grasos (b) insertados en la membrana citoplásmica, una molécula de glucosamina (GN) , tres manosas (M) y un puente de etanolamina fosforilada (E), la cual sirve de unión para la proteína anclada. En la figura se ilustra la diferencia en la composición de las colas lipídicas unidas al fosfatidilinositol en células nucleadas y eritrocitos de mamíferos (Modificado de Kinoshita, 2008).

1.4.1 Proteína CD59

CD59 es una proteína de 18kD que es dependiente de GPI y ha sido ampliamente usada en el ensayo *Pig-a*, se expresa en todos los subtipos de leucocitos, en plaquetas y E (Hernández et al., 2008). CD59 también es llamada MIRL (inhibidor de la lisis reactiva de membrana), su función es inhibir la formación del complejo de proteínas que promueve la formación de poros en la membrana que permiten la entrada de fluidos extracelulares, derivando en la muerte de la célula. Debido a su función de inhibidor de este sistema es también llamada protectina (Sugita et al., 1989; Ninomiya y Sims 1992). CD59 también participa en las vías de señalización en linfocitos, se ha reportado que su función consiste en proteger a las células sanguíneas y vasculares contra la lisis mediada por proteínas séricas del complemento; inhibiendo la formación de poros en la membrana, lo cual evita la lisis celular (Sugita et al., 1989).

Los experimentos descritos por Bryce et al., (2008), fueron diseñados para evaluar si la falta de anclajes GPI, especialmente en las moléculas CD59 y CD55, podrían constituir la base de un ensayo de mutación *in vivo*, especializado en medir, por medio de la citometría de flujo, la frecuencia de mutaciones inducidas. Estos experimentos se realizaron en poblaciones de E de ratas; las frecuencias observadas para los animales expuestos a mutágenos fueron, 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 et al., 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 et al., 1999; Bryce et al., 2008; Dobrovolsky et al., 2008; Miura et al., 2008a, b; Phonethepswath et al., 2008). La rata ha sido el modelo animal que se ha elegido para el ensayo (Pfuhrer et al., 2009).

1.4.2 Principio del ensayo *Pig-a*

Los estudios en el área de la toxicología genética han generado numerosos procedimientos *in vivo* e *in vitro*, para monitorear los efectos que diversos agentes físicos y químicos tienen sobre la integridad genética, así como los posibles riesgos que estos elementos representan para los organismos (Abramsson et al. 2000, Krishna y Hayashi 2000).

El ensayo *Pig-a in vivo* no requiere el uso de animales transgénicos y requiere de tiempos cortos de procesamiento de la muestra para la obtención de resultados ya que al realizarse por medio de citometría de Flujo, permite interrogar miles de células por minuto. Como ya se mencionó anteriormente, GPI es una molécula cuya función es anclar proteínas, estas proteínas dependientes de GPI aparecen en la superficie celular, y pueden ser detectadas por los anticuerpos apropiados conjugados con fluorocromos (Bryce et al, 2008; Peruzzi et al., 2010).

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 2** 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 et al., 2010).

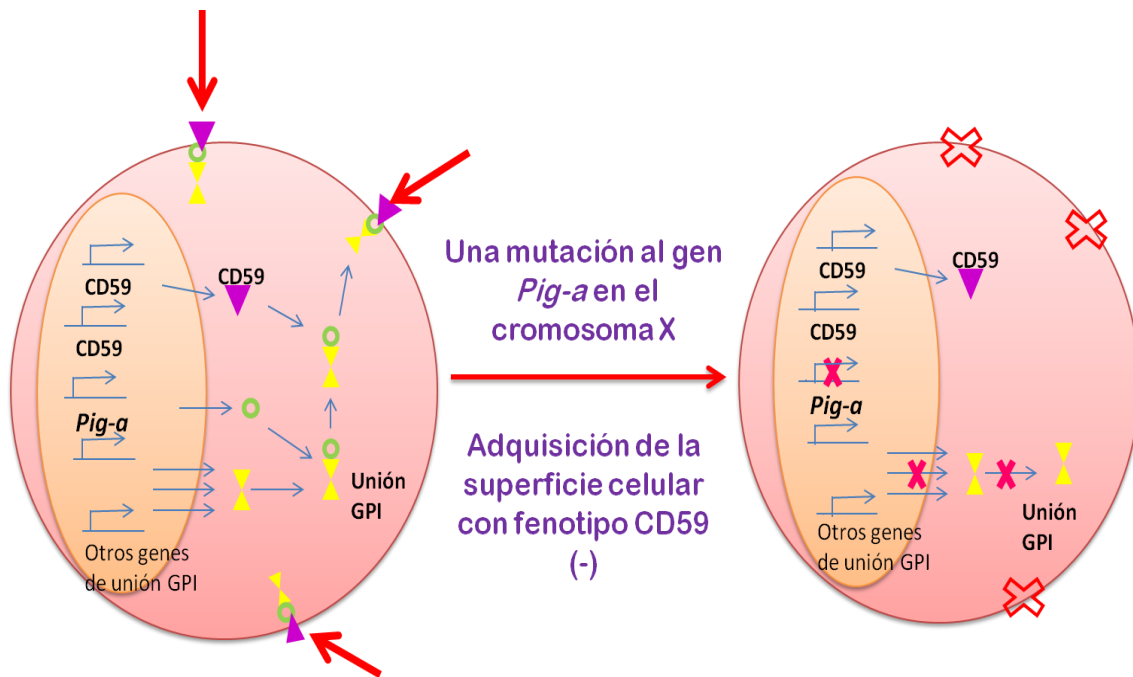


Figura 2. Célula normal y célula mutante *Pig-a*. A la izquierda se representa una célula que muestra la expresión de CD59 y GPI. El producto del gen *Pig-a* es sólo uno de varios genes necesarios para formar GPI, sin embargo, *Pig-a* es el único que se encuentra en el cromosoma X. A la derecha se observa 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 dependientes de GPI, incluyendo CD59. Este evento es raro, por lo que se ha sugerido que puede ser medido utilizando la citometría de flujo (Modificado de Bryce et al., 2008).

1.5 Mutaciones génicas

Una mutación génica es una alteración permanente en la secuencia del ADN que constituye un gen. Las mutaciones génicas para fines didácticos se clasifican principalmente en dos tipos:

- Mutaciones hereditarias: son mutaciones heredadas de los progenitores a los hijos y están presentes durante toda la vida de un individuo, estas mutaciones también se denominan mutaciones de línea germinal, ya que están presentes en las células germinales de los progenitores.
- Mutaciones somáticas: son mutaciones que se producen en algún momento durante la vida de una persona y pueden ser consecuencia de la exposición a compuestos químicos y/o por factores ambientales como la radiación solar, también son producidas por errores en la replicación del ADN (Genetics Home Reference, 2016).

Pocos son los reportes que se tienen de los efectos de la DN y en la frecuencia de mutaciones así como su posible relación a favorecer la susceptibilidad génica presente en organismos con DN3°, por lo que no se sabe cómo la DN afecta la frecuencia de mutaciones génicas.

1.5.1 N-etil-N-nitrosourea (ENU)

Los mutágenos son agentes físicos o químicos capaces de inducir un cambio heredable en la secuencia del genoma de los organismos (Griffiths et al., 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 mutaciones basales o “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).

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 es un agente alquilante que actúa mediante la transferencia de un grupo etilo a los radicales de oxígeno y nitrógeno del ADN (Caignard, 2014). Estudios *in vitro* e *in vivo* han identificado los productos del ADN expuesto a ENU, en el **Cuadro I** se presentan los porcentajes de etilación y productos producidos en las bases púricas y pirimidínicas del ADN (Goth y Rajewsky, 1974; Singer et al., 1981; Pegg, 1983; Zielenska et al., 1988; Singer y Dosanjh, 1990; van Zeeland et al., 1990).

Cuadro I. Aductos en el ADN después de la exposición a ENU.

<i>Producto</i>	<i>% total de etilación</i>	<i>Producto</i>	<i>% total de etilación</i>
Adenina		Citosina	
N-1	~0.1	O ²	2
N-3	4	N-3	~0.3
N-7	0.6		
Guanina		Timina	
N-3	1.5	O ²	7
O ⁶	8	N-3	0.4
N-7	12	O ⁴	2.5
		N total	20%
		O total	80%

Se presenta el porcentaje total de etilación así como los productos en bases púricas y pirimidínicas del ADN. La etilación se presenta en los radicales de O y N, siendo mayor el porcentaje de etilación en los radicales O (Tomado de Singer y Dosanjh, 1990).

ENU también causa mutaciones de pares de bases al azar (Justice et al., 1999).

Durante la replicación del ADN, los pares de bases etiladas provocan un error de identidad y la introducción de mutaciones puntuales. Noveroske et al. (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 paro se convirtió a un codón de aminoácido.

1.6 Uso de antibióticos en el manejo de la desnutrición

La DN comúnmente va acompañada de infecciones respiratorias y gastrointestinales (Rodríguez et al., 2011). Desde 1999 las normas de la OMS recomiendan administrar antibióticos de rutina para todos niños con DN3°, la administración de este tipo de fármaco surgió por la necesidad de tratar a los niños con DN3° como pacientes hospitalizados y estas encomiendas se han extendido a un subgrupo de pacientes denominados ambulatorios, que son niños que presentan DN3° sin complicaciones graves y sin infecciones clínicamente evidentes (Alcoba et al., 2013).

Si bien los antibióticos forman parte de la mayoría de los protocolos de manejo de la DN, existe poco análisis respecto a las pruebas detrás del actual método de tratamiento de diferentes antibióticos de rutina como son amoxicilina, metronidazol, ampicilina, gentamicina, trimetoprima y sulfametoxazol (TMP-SMX), en pacientes ambulatorios y graves. Las pruebas que apoyen las recomendaciones actuales de administración de antibióticos para el manejo de la DN3° sin complicaciones no son suficientes. Sin embargo, dado que estos antibióticos tienen efectos secundarios, los costos, riesgos, beneficios y su uso rutinario requieren de pruebas con urgencia para tener un control fiable de los mismos (Alcoba et al., 2013).

1.6.1 Trimetoprima y sulfametoxazol (TMP-SMX)

El TMP-SMX es una combinación ampliamente utilizada en el tratamiento de infecciones bacterianas, cuenta con un amplio espectro de actividad bactericida,

facilidad de administración, es de bajo costo y presenta baja incidencia de efectos secundarios (Ortiz et al., 2011).

Si bien, algunos autores reportan que no hay evidencia de que el TMP-SMX produzca deficiencias de folato en personas normales cuando se administra en las dosis recomendadas, en pacientes con deficiencias en ácido fólico, si puede causar megaloblastosis, leucopenia o trombocitopenia. En uso normal, la combinación parece ejercer poca toxicidad siendo alrededor del 75% de los efectos adversos relacionados con la piel, dichos efectos son producidos por las sulfonamidas. Sin embargo, TMP-SMX también ha sido reportado como causante de hasta tres veces el número de reacciones dermatológicas como lo hace sulfisoxazol cuando se administra por sí solo (Gilman et al., 1990).

En ratas tratadas con TMP-SMX en dosis orales de 200-533 y de 88-355 mg/kg de peso corporal se ha demostrado que sulfametoxazol induce malformaciones tales como el paladar hendido (USP DI, 1992). Sin embargo, al administrar por separado dosis de 192 mg/kg de trimetoprima y 512 mg/kg de sulfametoxazol no inducen el paladar hendido en ratas. La dosis letal reportada para ratón administrada vía oral es de 5513 mg/kg de peso corporal (Budavari: The Merck Index, 1989).

A pesar de ser un antibiótico eficaz, TMP-SMX tiene efectos adversos, así como interacciones fármaco-fármaco importantes, que pueden derivar en el desarrollo de hiperpotasemia; otros efectos tóxicos se presentan como anomalías neurológicas, renales y reproductivas, así como disminución de la capacidad de transporte de oxígeno, entre otros efectos hematológicos y síndromes de hipersensibilidad (Ho y Juurlink, 2011). Por ejemplo, el TMP-SMX administrado

con otros fármacos como el metotrexato puede aumentar la supresión en la médula ósea, probablemente como un efecto aditivo antifolato (AMA Drug Evaluations, 1991). A pesar de ello, son insuficientes los reportes de los efectos genotóxicos de TMP-SMX. Ortiz et al. (2011) reportan incrementos en la frecuencia de MN cuando combinaron dosis terapéuticas de estos antibióticos en ratas con DN3°.

2. Antecedentes

2.1 Estudios génicos de la desnutrición

La relación entre la DN y el daño genético ha sido ampliamente estudiada en humanos y en modelos animales (Ortiz et al., 2004; Padula y Seoane, 2008; Ortiz et al., 2011). En cuanto a las herramientas de estudio a nivel génico, se reportó al gen de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*HPRT*) en el modelo de rata cepa Wistar con el método de inducción de DN por competencia de alimento durante la lactancia; sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos desnutridos experimentalmente contra los testigos (Cortés, 1993). Recientemente se ha implementado un método a nivel génico, para estudiar los efectos de la DN tomando como indicador de daño a la frecuencia de mutaciones somáticas en el gen *Pig-a* en E de sangre periférica de rata, el modelo usado fue el de inducción de DN por competencia de alimento durante la lactancia, en este trabajo se observaron diferencias significativas en la frecuencia de mutaciones somáticas, siendo los grupos desnutridos los que

presentaron la mayor frecuencia en comparación con los grupos testigo (Pacheco, 2012).

2.2 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: eritrocitos, leucocitos (que incluyen los distintos linfocitos) y plaquetas (Hayashi et al., 2000). Los E son responsables de realizar la función altamente especializada de transporte de oxígeno, por lo que es esencial para la supervivencia durante la gestación y la vida postnatal (Barminko et al., 2015).

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 et al., 2000).

Los E son células altamente especializadas, que maduran a partir de los RET que contienen 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 en roedores tarda de 2 a 3 días, desde su estancia en la médula ósea y su liberación hacia la circulación

(Gronowicz y et al., 1984; Wiczling y Krzyzanski, 2008). 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).

En 2009 Miura et al., reportaron un esquema que muestra el modelo de eritropoyesis en rata cuando se exponen los organismos a ENU y ejemplifica la formación de mutantes *Pig-a* y su detección en sangre periférica, en la **Figura 3** en el panel A se muestran los tiempos de maduración de la eritropoyesis normal en sangre de rata, en el panel B se presenta la eritropoyesis donde previamente la rata fue expuesta a ENU y como resultado se obtiene la formación de mutantes *Pig-a* y su circulación en sangre periférica, donde se pueden identificar los fenotipos no mutantes y mutantes en RET y E.

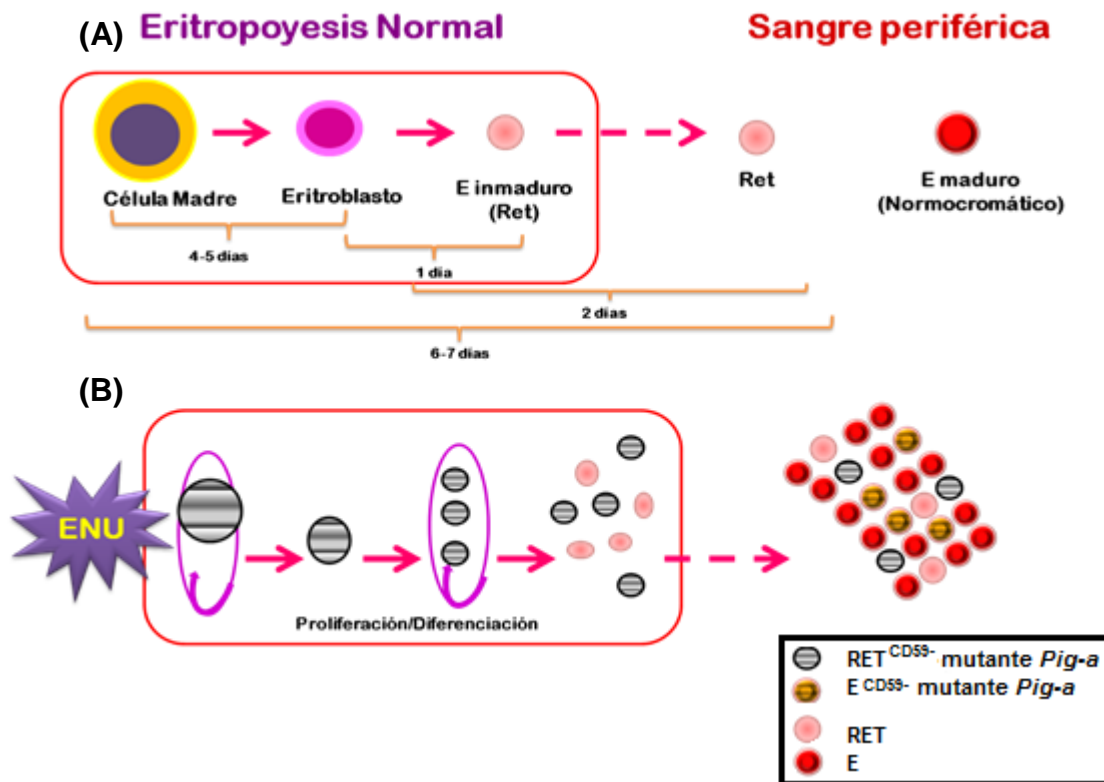


Figura 3. Eritropoyesis normal y formación de mutantes *Pig-a* en sangre periférica de rata. Panel **A**: se muestra el tiempo que tarda la maduración de E. La eritropoyesis normal se representa como la generación de E inmaduros a partir de células madre en la médula ósea (la parte superior izquierda de la figura) y el tránsito de las células (flecha punteada) en la periferia, donde la maduración culmina en E maduros. Panel **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 sangre periférica (Modificado de Miura et al., 2009).

3. Planteamiento del problema y pregunta de investigación

La DN ha sido estudiada ampliamente a nivel citogenético, sin embargo, en cuanto a nivel génico no se cuenta con suficientes reportes que muestren si es posible relacionar la falta de nutrientes con la susceptibilidad génica. En un trabajo previo se demostró que las ratas desnutridas experimentalmente presentan mayor frecuencia de mutantes *Pig-a* en E de sangre periférica, de acuerdo con este antecedente es primordial dilucidar si efectivamente la relación de déficit de nutrimentos favorece e incrementa la susceptibilidad génica de individuos en edades tempranas y adulta. Es por ello que en este trabajo se planteó determinar por medio de los ensayos para la detección de genotoxicidad (MN) y mutagénesis (*Pig-a*), si se presenta esta relación, estudiando los cambios en las frecuencias de mutantes *Pig-a* y de MN en RET y E obtenidos de ratas con DN2° y DN3°. Con base en la información de ambos ensayos que son complementarios, se pretende dar respuesta a la siguiente interrogante:

¿La DN2° y la DN3° estarán asociadas con la susceptibilidad genotóxica y mutagénica en ratas, tomando como indicadores el ensayo de MN y el ensayo *Pig-a*?

4. Justificación

La DN sigue siendo un problema de salud pública, es un padecimiento que afecta y produce múltiples alteraciones en los individuos, por lo que ha sido objeto de varios estudios en diferentes niveles como son celular, bioquímico, inmunológico y citogenético. Se han realizado estudios con métodos citogenéticos como son las AC, ICH, MN y por medio del ensayo cometa, todos ellos en modalidad *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, se ha demostrado que la DN induce un daño al material genético de las células; sin embargo, es importante resaltar que la información que se tiene acerca de la susceptibilidad génica asociada a la DN es mínima. Por lo que el estudio de las mutaciones somáticas, asociado a ensayos complementarios como son el ensayo de MN, resulta esencial para analizar la posible inestabilidad génica que puede surgir de la deficiencia de nutrientes. Se ha reportado que al término de la lactancia, la falta de nutrientes conlleva a la presencia de daño en el material genético; sin embargo no se tienen reportes de éste daño en organismos en etapas posteriores a la lactancia, es decir, en ratas jóvenes. El cambio de la etapa de lactancia a la juventud puede ser crucial en el estudio a niveles citogenéticos y génicos.

Por otro lado, en las últimas décadas se ha considerado que el estudio de las mutaciones somáticas es tan importante como el análisis de las mutaciones que se heredan, principalmente porque las mutaciones somáticas son puntos clave en la patogenia de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Por lo tanto, es importante evaluar los efectos genotóxicos de mutágenos en células de organismos desnutridos, cuyos efectos podrían provocar alteraciones en su función y conducir posiblemente a la carcinogénesis. Recientemente, se ha

estandarizado el ensayo *Pig-a* en el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la División de Ciencias Biológicas de la UAM-I, la introducción de este ensayo es prometedor y se tienen resultados preliminares de la evaluación de daño al material genético de RET y E de sangre periférica de ratas con DN3°.

5. Hipótesis

Si la DN provoca daño al ADN en células eritropoyéticas, entonces en los RET y E provenientes de ratas desnutridas experimentalmente se observarán incrementos en el porcentaje de MN y en la frecuencia de mutantes en el gen *Pig-a*.

Si la DN2° se asocia con mayor sensibilidad a la exposición a ENU se incrementarán las afectaciones en el material genético.

Si el TMP-SMX tiene efecto genotóxico el porcentaje de MN será mayor y si presenta potencial mutagénico se incrementará la frecuencia de mutantes. Estas alteraciones serán mayores en las ratas con DN3°.

6. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto genotóxico y mutagénico de la DN2° y la DN3° en RET y E de sangre periférica de ratas, por medio del ensayo de MN y el de la mutación somática en el gen *Pig-a*. Valorar el efecto de la exposición a ENU en ratas con DN2° y del tratamiento con TMP-SMX en ratas con DN3°, empleando los ensayos mencionados.

Objetivos Particulares

1. Evaluar las frecuencias de MN en ratas bien nutridas y con DN2° y DN3°.
2. Determinar y comparar la frecuencia de MN en RET y E de ratas bien nutridas y con DN2° expuestas y no expuestas a ENU.
3. Determinar y comparar la frecuencia de MN en RET y E de ratas bien nutridas y DN3° expuestas y no expuestas a TMP-SMX.
4. Evaluar por medio del análisis de la mutación somática en el gen *Pig-a*, la frecuencia de mutantes en ratas bien nutridas.
5. Determinar la frecuencia de mutantes en ratas con DN2° y DN3° por medio del análisis de la mutación somática en el gen *Pig-a*.
6. Comparar la frecuencia de mutación en el gen *Pig-a*, en ratas bien nutridas y ratas con DN2°, expuestas y no expuestas a ENU.
7. Comparar la frecuencia de mutación en el gen *Pig-a*, en ratas bien nutridas y ratas con DN3°, expuestas y no expuestas a TMP-SMX.
8. Comparar las frecuencias basales de mutación *Pig-a* y de MN en ratas con DN2° y DN3°.

7. Método

7.1 Inducción de desnutrición experimental post-natal

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, la Norma Oficial Mexicana (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y los Institutos Nacionales de Salud (NIH) para el manejo de animales de experimentación. Se usaron ratas Wistar-Han producidas en el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Todos los animales fueron alojados en salas convencionales para

animales y se mantuvieron bajo un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Las madres lactantes fueron alimentadas con una dieta equilibrada para roedores (TEKLAD GLOBAL, Brentwood, MO, EE.UU.) y siempre contaron con agua *ad libitum* filtrada.

Se indujo la DN experimental post-natal a través del método de competencia de alimento (Ortiz et al., 1996), ratas de un día de edad, de diferentes camadas fueron asignados al azar al grupo experimental/DN, o el grupo testigo/BN.

En el grupo BN, de 6 a 8 crías machos y hembras fueron alimentados por una nodriza, mientras que en el grupo DN de 16 crías machos y hembras fueron colocados con una nodriza. Ratas BN y DN fueron seleccionados de diferentes camadas. Se establecieron los grados de DN con base en el déficit de peso, tomando como referencia el peso de las ratas BN; se consideró como DN2° cuando el déficit de peso fue de 25-40%, y se seleccionaron las crías con DN3° cuando el déficit de peso fue mayor al 40%. Las crías se mantuvieron con las nodrizas después del nacimiento hasta el día de destete.

Las crías se pesaron cada dos días, durante los experimentos. Los datos registrados se utilizaron para calcular el déficit de peso de cada individuo y así determinar el grado de DN que presentaron las crías. Bajo este criterio, se consideró que las ratas con un déficit de peso de 25-40% presentaban DN2° y con un déficit mayor de 40% presentaban DN3°. Las crías se mantuvieron con la nodriza hasta los 21 días de edad (DE) (destete).

7.2 Desnutrición experimental post-destete

Para mantener el grado de DN (2° ó 3°) obtenido durante la inducción experimental post-natal, después del destete, las ratas fueron asignadas a grupos BN y DN, los grupos BN fueron alimentados con una dieta normoproteica (18% proteína, TEKLAD GLOBAL) y los grupos DN recibieron una dieta hipoproteica por medio de la restricción de la cantidad de alimento del 50% para los grupos con DN2° y restricción del 75% para el grado de DN3°.

7.3 Administración de ENU

Las ratas de dos semanas de edad (DE 14) se trataron con 0, 20 ó 40 mg/kg de ENU por 3 días consecutivos (DE 14 al 16), con un volumen de dosificación de 10mL/kg de peso corporal (Phonethepswath et al., 2010). En cada día de administración, ENU fue preparado en PBS se ajustó a pH 6,1. Los animales se pesaron antes de la dosificación y se dividieron en grupos de tratamiento, con 6 animales por grupo, en el **Cuadro 2** se muestran los grupos de estudio.

Cuadro 2. Grupos de estudio de ratas BN y con DN2° expuestos a ENU

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Ratas BN vehículo (testigo n=6)	Ratas BN con dosis 20 mg/kg/3días (n=6)	Ratas BN con dosis 40 mg/kg/3días (n=6)
Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Ratas DN2° vehículo (testigo n=6)	Ratas DN2° con dosis 20 mg/kg/3días (n=6)	Ratas DN2° con dosis 40mg/kg/3días (n=6)

n= número de ratas por grupo.

7.3.1 Toma de muestra de sangre periférica

Previo a la administración de ENU, se realizó una toma de muestra de sangre periférica para obtener los valores basales, esta muestra se tomó en DE 14 y se denotó como día -1. Después de la última administración, cada 7 días se realizó el muestreo y fueron denotados como los días: 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, y 63. Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal (130-160 µL), y se colocaron en tubos heparinizados. De las muestras colectadas 30 µL se utilizaron para llevar a cabo el ensayo *Pig-a*.

7.4 Administración de TMP-SMX

A los grupos con DN3° se les administró TMP-SMX por vía oral de la siguiente forma:

En el DE 42, se les administraron 10mg/kg/día durante 5 días (dosis total 50/250mg) ó 10 días consecutivos (dosis total 100/500mg) de TMP-SMX en dos tomas cada 12 horas (protocolo de administración de TMP-SMX en el Hospital Pediátrico de Iztapalapa). El vehículo del TMP-SMX fue agua inyectable. Con base en la dosis administrada, se conformaron los siguientes grupos de estudio (**Cuadro 3**):

Cuadro 3. Grupos de estudio de ratas BN y con DN2° tratados con TMP-SMX.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Ratas BN vehículo (testigo n=6)	Ratas BN con dosis 50/250 mg/kg/5días (n=6)	Ratas BN con dosis 100/500 mg/kg/10días (n=6)
Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Ratas DN3° vehículo (testigo n=6)	Ratas DN3° con dosis 50/250 mg/kg/5días (n=6)	Ratas DN3° con dosis 100/500 mg/kg/10días (n=6)

n= número de ratas por grupo.

7.4.1 Toma de muestra de sangre periférica

Previo a la administración de TMP-SMX, se realizó una toma de muestras de sangre periférica para obtener valores basales, esta muestra se tomó el DE 42 y para fines de administración de la combinación de TMP-SMX y elaboración de gráficas se denotó como día -1, y después de la última administración, se realizó el muestreo cada 15 días, denotando los días como: -1, 15, 30 y 45. Las muestras

de sangre de 130-160 μL , se tomaron a través de la vena caudal y se colocaron en tubos heparinizados, de la sangre colectada en cada tiempo, 30 μL se utilizaron para llevar a cabo el ensayo *Pig-a* en y 100 μL de sangre fueron colectados para en ensayo de MN.

7.5 Obtención y fijación de la muestra para ensayo de MN

Se colectaron muestras de 100 μL de sangre periférica de la vena caudal usando un bisturí y puntas previamente tratadas con heparina sódica como anticoagulante. Las muestras fueron diluidas 1:2 con solución amortiguadora de bicarbonato (BBS) a pH 7.5. Se tomaron alícuotas de 100 μL que fueron fijadas en metanol a -70°C . Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en un ultra congelador al menos durante 24 horas (Dertinger et al., 1996).

7.6 Marcaje y procesamiento de muestras

Las muestras se lavaron con 7 mL de BBS frío para eliminar el exceso de fijador y se centrifugaron a 600 x g por cinco minutos, posteriormente se recuperó el botón celular y se tomaron 20 μL para tratar las células simultáneamente con 1 mg de RNasa/mL y anti-CD71-FITC (utilizado para marcar diferencialmente las células con alto contenido del receptor a transferrina).

Las células fueron incubadas a 4°C por 40 min y después a 22°C durante 90 min para asegurar la degradación completa del ARN celular. Se adicionaron 500 μL de BBS y se mantuvieron a 4°C . Al momento del análisis, para identificar a los RET-MN se agregó la solución de yoduro de propidio frío (IP 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BBS).

7.7 Análisis por Citometría de Flujo

En todos experimentos se utilizó el citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson, Sistemas Immunocytometry, San Jose, CA, EE.UU.) que ejecuta el software CellQuest™ Pro versión 3.0.1 para la adquisición y análisis de datos (BD Biosciences) y funciona con láser de argón a 488 nm de excitación. Se adquirieron 1×10^6 eventos por muestra.

7.8 Selección de la región de análisis

Se desplegaron gráficas de puntos con la siguiente estrategia de regionalización: Se realizó la primera región con “Forward Scatter” (tamaño celular) contra “Side Scatter” (complejidad interna celular) para delimitar la región de células a analizar. Una segunda gráfica de puntos fue desplegada de acuerdo a la tinción CD71-FITC contra IP para eliminar células nucleadas y una tercera grafica con base al contenido de ADN usando la tinción CD71-FITC contra IP fue usada para distinguir las diferentes poblaciones de eritrocitos (**Figura 4**).

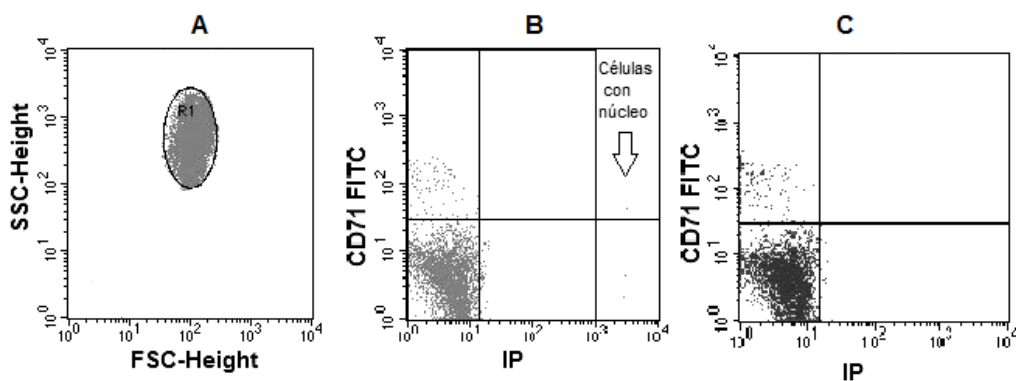


Figura 4. Gráficas de puntos que muestran la estrategia de selección de las regiones de análisis de los MN. **A:** Se realizó la primera región con “Forward Scatter” (tamaño celular) contra “Side Scatter” para delimitar la región de células a analizar. **B:** gráfica de puntos desplegada de acuerdo a la tinción CD71-FITC contra Yoduro de propidio (IP) para eliminar células nucleadas. **C:** grafica con base al contenido de ADN usando la tinción CD71-FITC contra IP para distinguir las diferentes poblaciones de eritrocitos.

7.9 Tinción diferencial de diferentes poblaciones de eritrocitos

Una vez “delimitada” la región de análisis, de acuerdo a la tinción con anti-CD71-FITC y IP, se detectaron las diferentes poblaciones de eritrocitos: eritrocitos (E), eritrocitos con micronúcleo (E-MN), reticulocitos (RET) y reticulocitos con micronúcleo (RET-MN) (**Figura 5**) (Parker, 1993; Dertinger et al., 2000). Los porcentajes de RET, RET-MN y E-MN fueron calculados de acuerdo a la propuesta por los laboratorios “Litron” (Litron Rochester, NY; Ortiz et al., 2004).

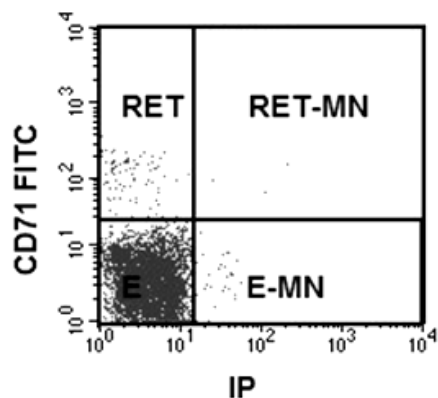


Figura 5. Gráfica de puntos con muestra tinción diferencial. Esta gráfica se utilizó para identificar de acuerdo a la tinción con anti-CD71-FITC y IP, las diferentes poblaciones de eritrocitos: eritrocitos (E), eritrocitos con micronúcleo (E-MN), reticulocitos (RET) y reticulocitos con micronúcleo (RET-MN).

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

Las muestras se procesaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Phonethespwath et al. (2010), a excepción de la etapa de leucodepleción y se transfirieron a tubos que contenían 100 μ L de solución de heparina (500 U/mL PBS). A cada muestra (130 μ L) se le adicionaron 155 μ L de PBS y se re-suspendieron a través de pipeteo suave, después se centrifugó a 800 x g durante 5 min y el sobrenadante se retiró, posteriormente y se añadieron 155 μ L de PBS. Enseguida 150 μ L de esta suspensión se transfirieron a un tubo de polipropileno que contenía 100 μ L de la siguiente mezcla: 3 partes anti-CD59-PE [anticuerpo contra CD59 conjugado con ficoeritrina (PE), que se utiliza para detectar mutaciones con base en la deficiencia en la expresión de esta proteína] y 17 partes de PBS + 2% v/v de suero bovino/fetal.

Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min, seguido de dos lavados de 5 min con 1 mL de PBS a 800 g. A continuación, se eliminó el sobrenadante, y el

sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS que contenía 150 nM SYTO 13, seguido de incubación a 37°C durante 30 min. Las muestras marcadas con SYTO se mantuvieron en hielo hasta sus análisis.

7.11 Análisis por Citometría de Flujo

Se realizó utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur descrito anteriormente. Se adquirieron 1.5×10^6 E/muestra y se calcularon los mutantes por millón de E. Para el análisis de RET, se añadió 0.5 mL de SYTO 13 antes de la adquisición de cada muestra; se analizaron 0.3×10^6 RET y se calcularon los mutantes por millón de RET.

7.12 Selección de la región de análisis

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 (contenido de ARN) para excluir células nucleadas. La tercera región se hizo con FL2-Área contra FL2-Width para excluir dobletes y agregados celulares (**Figura 6**).

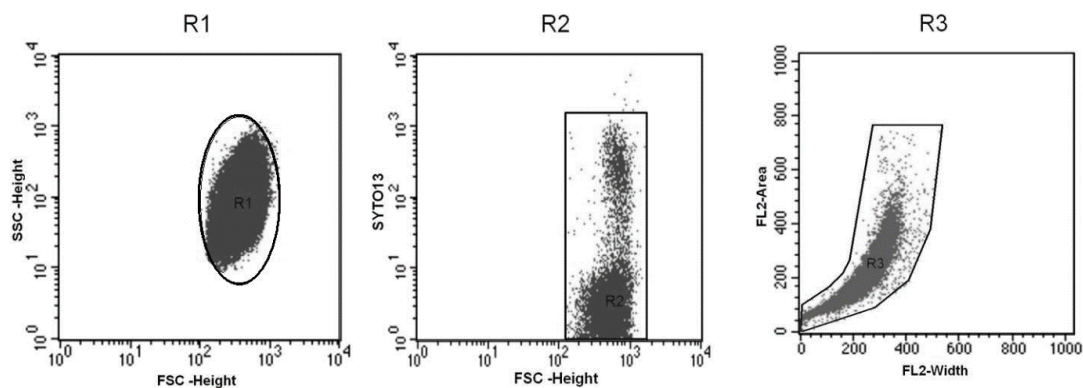


Figura 6. Gráficas de puntos que muestran la estrategia de selección de las regiones de análisis. Panel **R1** se muestra la primera región con “Forward Scatter” contra “Side Scatter”. Panel **R2** se muestra la segunda región FSC-Height contra SYTO 13. Panel **R3** se muestra la tercera región FL2-Área contra FL2-Width. La muestra de calibración se realizó cada día de toma de muestra. Las células fueron adquiridas en un promedio de 2000-4000 células/segundo.

7.13 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 colocaron el 50% de células de la muestra de la rata BN 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.

Los objetivos de esta muestra fueron calibrar los fotomultiplicadores del citómetro y para ubicar en las gráficas de punto los cuadrantes de las diferentes poblaciones mutantes de las no mutantes (Phonetheswath et al., 2010) (**Figura 7**).

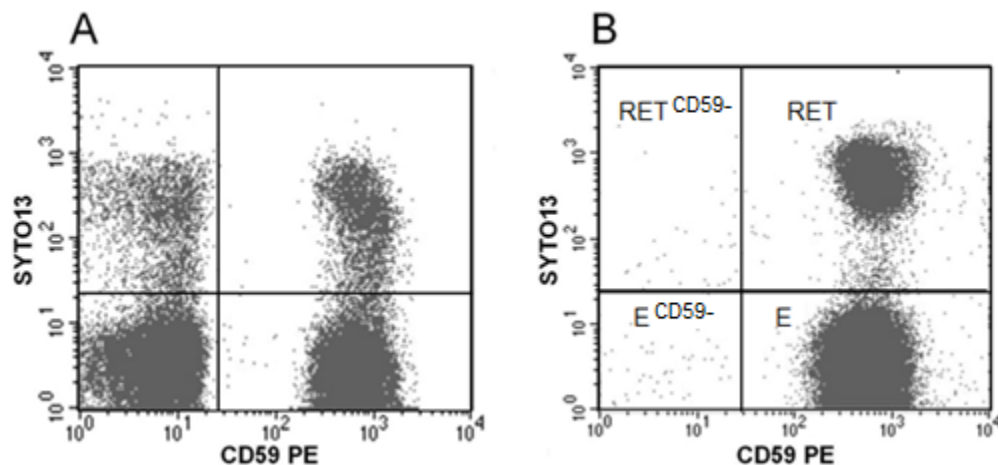


Figura 7. Gráficas de puntos con muestra del instrumento de calibración. Panel **A**: muestra pseudomutante para ubicar cuadrantes y poblaciones de estudio la SYTO13 contra CD59 PE. Panel **B**: Poblaciones de estudio reticulocitos mutantes (RET^{CD59-}), reticulocitos no mutantes (RET), eritrocitos mutantes (E^{CD59-}) y eritrocitos no mutantes (E).

7.14 Análisis estadístico de los resultados

El peso corporal está expresado como el promedio \pm error estándar ($\bar{x} \pm E.E.$) y se compararon mediante pruebas t-Student y prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Para cada grupo de estudio se calculó el promedio y el error estándar (promedio \pm E. E.) de la frecuencia de RET; RET-MN y E-MN. Se comparó la frecuencia de MN entre los grupos de estudio utilizando una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de U de Mann-Whitney, seguido de la prueba Sidak para comparaciones múltiples con una $p < 0.05$. La FM se expresan como el promedio \pm error estándar (promedio \pm E.E.). Las frecuencias de mutación (FMs) de RET^{CD59-} y E^{CD59-} se expresan por 10^6 RET o E totales, y los datos fueron transformados usando $\log_{(10)}$. El índice de RET se expresa como el porcentaje de la frecuencia. Todos los grupos se compararon mediante análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba Sidak para comparaciones múltiples de

con un valor de $p \leq 0.05$ para indicar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico GraphPad Prisma versión 6.0 (San Diego, CA, EE.UU.).

8. Resultados

8.1 Desnutrición 2°: peso corporal

Los animales con DN2° tuvieron un peso significativamente menor comparado con el peso de los animales BN. Cuando los animales fueron expuestos a ENU, se observó una disminución en el peso corporal con relación a los grupos testigo. Por ejemplo, en comparación con el grupo BN testigo, el peso corporal de las ratas BN expuestas a 20 mg/kg/día ENU fue significativamente menor en los días 49 a 63, mientras que el peso corporal de las ratas BN tratadas con 40 mg/kg/día ENU fue significativamente menor en los días 28 a 63 (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Peso de las ratas BN y DN2° expuestas y no expuestas a ENU.

	BN testigo	BN 20 mg/kg/día	BN 40 mg/kg/día
	Peso corporal	Peso corporal	Peso corporal
Tiempo (día)	<i>(g) $\bar{x} \pm E.E.$</i>	<i>(g) $\bar{x} \pm E.E.$</i>	<i>(g) $\bar{x} \pm E.E.$</i>
-1	35.1 ± 0.8	35.9 ± 1.4	34.5 ± 1.7
7	52.9 ± 0.5	52.0 ± 2.5	48.1 ± 2.6
14	73.0 ± 2.5	75.7 ± 3.0	67.6 ± 3.9
21	119.1 ± 1.6	98.2 ± 2.5	95.1 ± 6.8 ^a
28	174.1 ± 2.7	147.8 ± 2.6 ^a	135.2 ± 8.8 ^a
35	206.4 ± 9.1	177.3 ± 4.9 ^a	172.8 ± 12.3 ^a
42	240.5 ± 4.8	186.7 ± 10.4 ^a	191.0 ± 15.1 ^a
49	286.5 ± 14.5	263.2 ± 12.5	244.1 ± 21.2 ^a
56	313.0 ± 12.2	302.7 ± 6.9	276.1 ± 20.2 ^a
63	365.9 ± 15.7	329.7 ± 4.3 ^a	298.8 ± 19.1 ^a
	DN2° testigo	DN2° 20 mg/kg/día	DN2° 40 mg/kg/día
	Peso corporal	Peso corporal	Peso corporal
Tiempo (día)	<i>(g) $\bar{x} \pm E.E.$</i>	<i>(g) $\bar{x} \pm E.E.$</i>	<i>(g) $\bar{x} \pm E.E.$</i>
-1	23.7 ± 0.8 *	26.5 ± 0.8 *	25.2 ± 0.7 *
7	34.5 ± 0.6 *	39.5 ± 1.9 *	34.0 ± 1.0 *
14	49.2 ± 1.1 *	38.6 ± 3.0 *	47.5 ± 1.3 *
21	61.5 ± 9.9 *	70.9 ± 5.4 *	60.4 ± 3.4 *
28	99.0 ± 4.5 *	97.3 ± 1.7 *	65.0 ± 1.4 * ^b
35	129.4 ± 5.7 *	114.9 ± 5.0 *	81.5 ± 6.5 * ^b
42	158.0 ± 10.6 *	149.9 ± 9.1 *	99.1 ± 10.4 * ^b
49	207.8 ± 12.8 *	170.3 ± 11.1 * ^b	112.8 ± 11.6 * ^b
56	221.9 ± 9.2 *	193.8 ± 14.7 * ^b	128.4 ± 10.1 * ^b
63	252.9 ± 13.7 *	205.0 ± 14.9 * ^b	174.8 ± 17.1 * ^b

Se presenta el promedio ± error estándar (E.E.). El día -1 corresponde al previo a la administración de ENU (DE 14). * Diferencias significativas entre el peso de los grupos con DN2° y los grupos BN, expuestas y no expuestas a ENU, $p \leq 0.05$, $n=6$; a diferencias significativas entre grupos BN con 20 y 40 mg/kg/día comparados con el grupo BN testigo, $p \leq 0.05$, $n=6$; b diferencias significativas entre los grupos DN2° expuestos a 20 and 40 mg/kg/día comparados con el grupo DN2° testigo, $p \leq 0.05$, $n=6$.

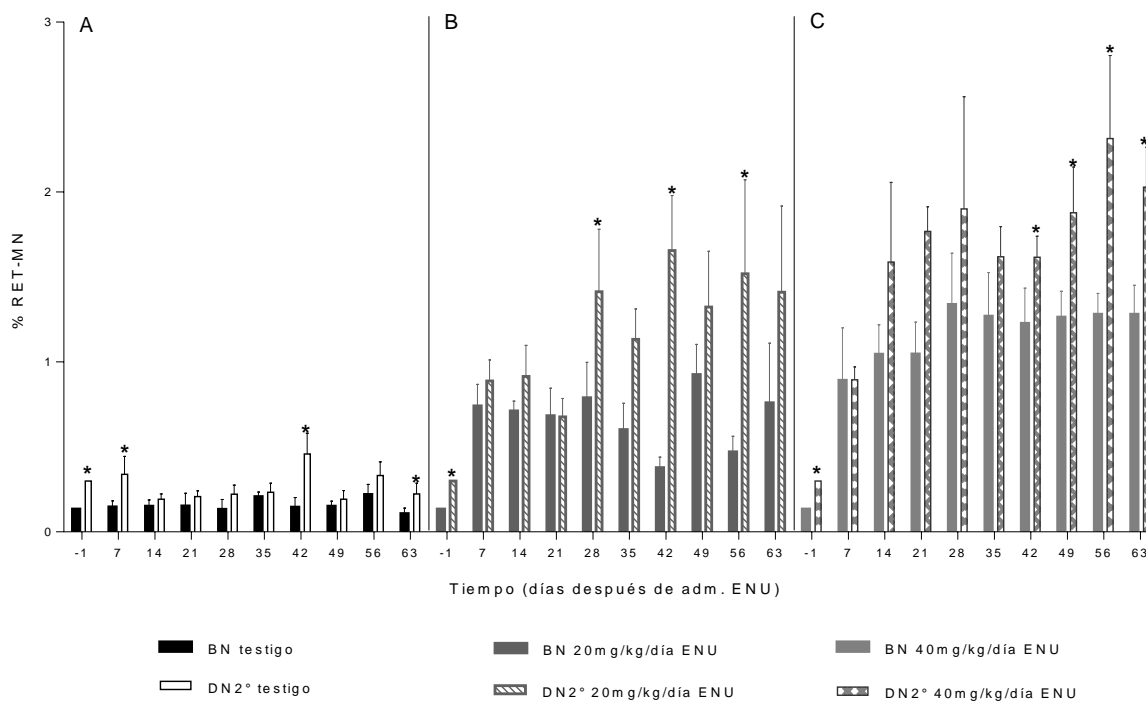
8.2 Efectos de la desnutrición moderada

8.2.1 Efecto Genotóxico

8.2.1.1 Porcentaje de RET-MN

Los porcentajes (%) de RET-MN fueron evaluados durante un periodo de 63 días (9 semanas). En la **Gráfica 1** se muestra en el panel **A** se muestran los grupos testigo, se presentaron diferencias significativas en el grupo testigo con DN2° comparado con el grupo BN testigo en los días -1, 7, 42 y 63 siendo mayor el porcentaje de RET-MN en el grupo con DN2°. En el panel **B**, se muestran los grupos BN y DN2° expuestos a 20 mg/kg/día ENU, se observó un porcentaje alto en los tiempos de muestreo -1, 28, 42 y 56 en el grupo DN2° comparado con el grupo BN.

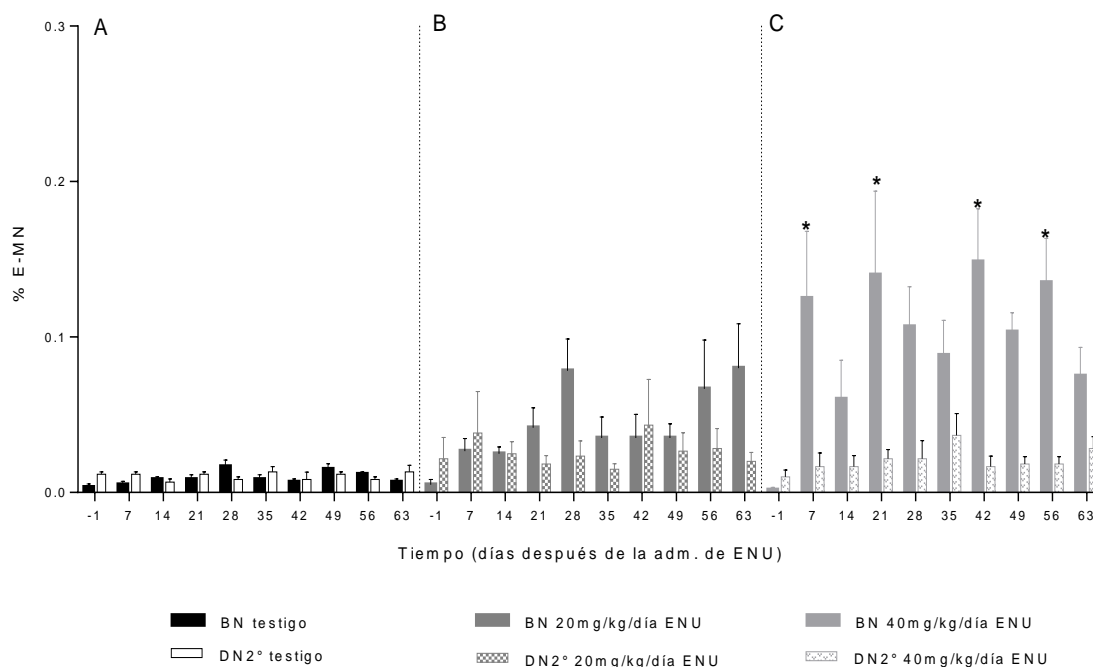
Se presentó un comportamiento similar en los grupos con 40 mg/kg/día ENU (panel **C**), donde el grupo con DN2° presentó mayor porcentaje de RET-MN en los días -1, 42, 49, 56 y 63.



Gráfica 1. Porcentaje de RET-MN en sangre periférica de ratas bien nutridas y con DN2° expuestas y no expuestas a dos dosis de ENU. Se muestra promedio y E.E. Panel **A** se muestran (*) diferencias significativas entre los grupos BN y DN2° sin tratamiento; en el panel **B** se muestran (*) diferencias significativas entre los grupos con la dosis de 20 mg/kg/día ENU y en el panel **C**, se muestran (*) diferencias significativas entre los grupos con dosis de 40 mg/kg/día ENU, $p \leq 0.05$, $n=6$.

8.2.1.2 Porcentaje de E-MN

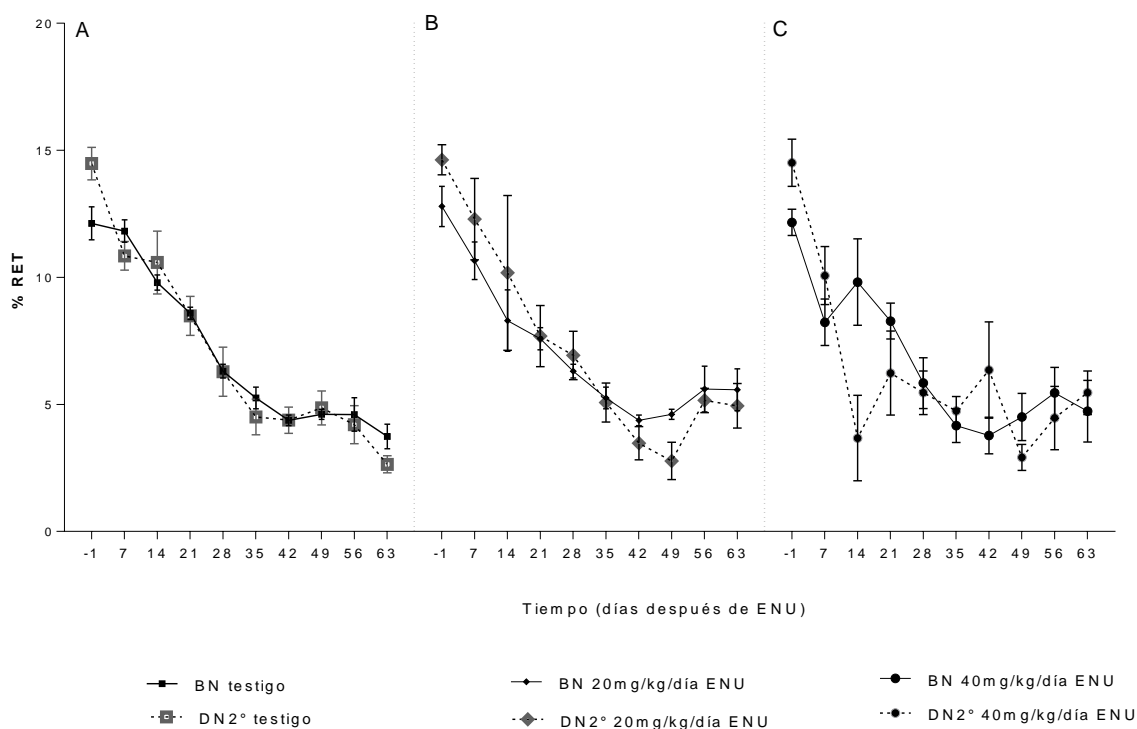
En la Gráfica 2 (panel A) se muestran los grupos testigos, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de E-MN. En el panel B se muestran los grupos BN y con DN2° expuestos a 20 mg/kg/día ENU, no se encontraron diferencias significativas. En el panel C se muestran los grupos BN y DN2° expuestos a 40 mg/kg/día ENU, se encontraron diferencias significativas siendo el grupo bien nutrido con mayor porcentaje en los días 7, 21, 42 y 56.



Gráfica 2. Porcentaje de E-MN en sangre periférica de ratas bien nutridas y con DN2° expuestas y no expuestas a dos dosis de ENU. Se muestra promedio y E.E. Panel A se muestran (*) diferencias significativas entre los grupos BN y DN2°; en el panel B se muestran (*) diferencias significativas entre los grupos BN 20 mg/kg/día ENU y DN2° 20 mg/kg/día ENU; en el panel C, se muestran (*) diferencias significativas entre los grupos; BN 40 mg/kg/día ENU y DN2° 40 mg/kg/día ENU, $p \leq 0.05$, $n=6$.

8.2.1.3 Porcentaje de RET

Se evaluó el porcentaje de los RET en todos los grupos de estudio, en la **Gráfica 3** se muestran el comportamiento de los porcentajes de cada uno de los grupos, en el panel **A** se muestra el % RET de los grupos bien nutrido testigo y con DN2° testigo, en el panel **B** se presentan los grupos bien nutridos y con DN2° expuestos a la dosis de 20 mg/kg/día y en el panel **C** se muestran los grupos expuestos a la dosis de 40 mg/kg/día. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos BN y con DN2° testigo y expuestos a las dosis de ENU.



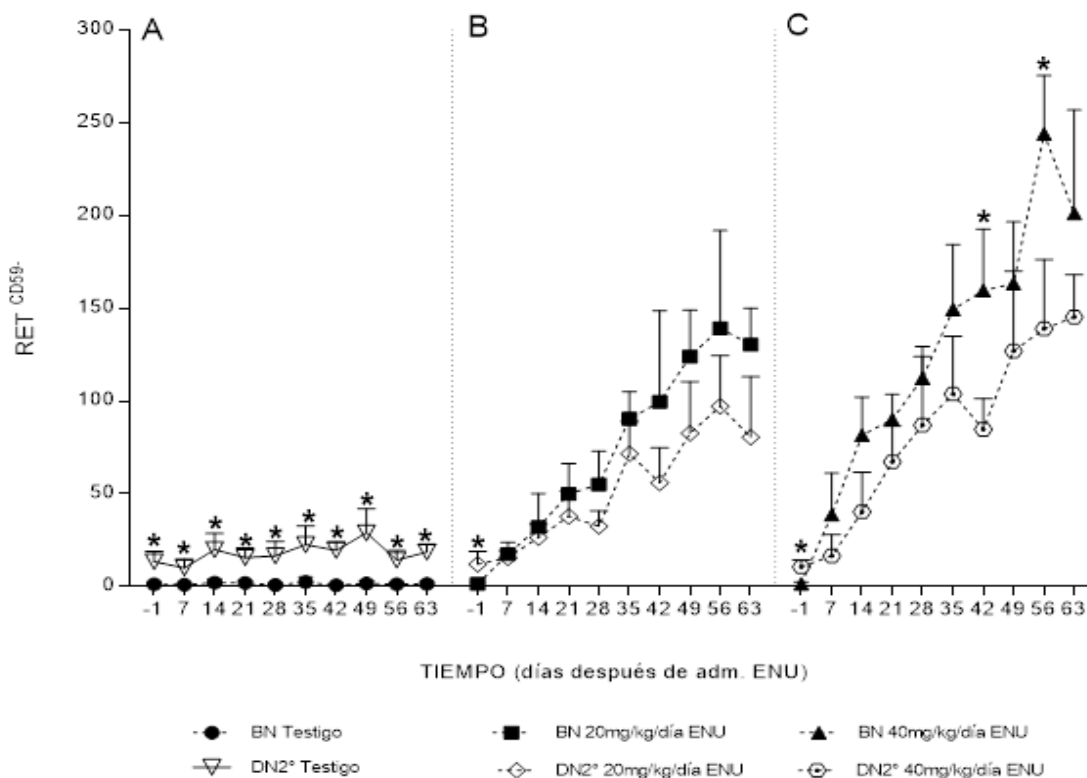
Gráfica 3. Porcentaje de RET en sangre periférica de ratas bien nutridas y desnutridas expuestas y no expuestas a dos dosis de ENU. Se muestra promedio y E.E. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos BN y los grupos con DN2° expuestos y no expuestos a ENU, $n=6$.

8.2.3 Efecto Mutagénico

8.2.3.1 Frecuencia de RET mutantes (RET^{CD59-})

Las FMs *Pig-a* fueron monitoreadas durante un periodo de 63 días (9 semanas) en RET (**Gráfica 4**) de ratas con DN2° y BN, los resultados se muestran como el promedio \pm E.E. En las figuras los datos están distribuidos en tres categorías de tratamiento: testigo y 20 o 40 mg/kg/día ENU. En las ratas DN2° testigo, las FMs de RET^{CD59-} fueron consistentemente más altas que el grupo BN testigo. Durante el período de estudio, el promedio de la FM de RET^{CD59-} en el grupo BN testigo se mantuvo en 1.4×10^{-6} , en el grupo con DN2° la frecuencia varió desde 13.5 a 18.8×10^{-6} (**Gráfica 4**, panel **A**).

Se observó aumento en la FM de RET^{CD59-} dependiente de la dosis y tiempo desde el día 7 al día 63 en ratas BN y en ratas DN2° expuestas a ENU (paneles **B** y **C**). La exposición a las dosis de ENU aumentó la FM *Pig-a* en RET de BN y DN2° sin embargo, la diferencia entre los grupos no fue estadísticamente significativa.

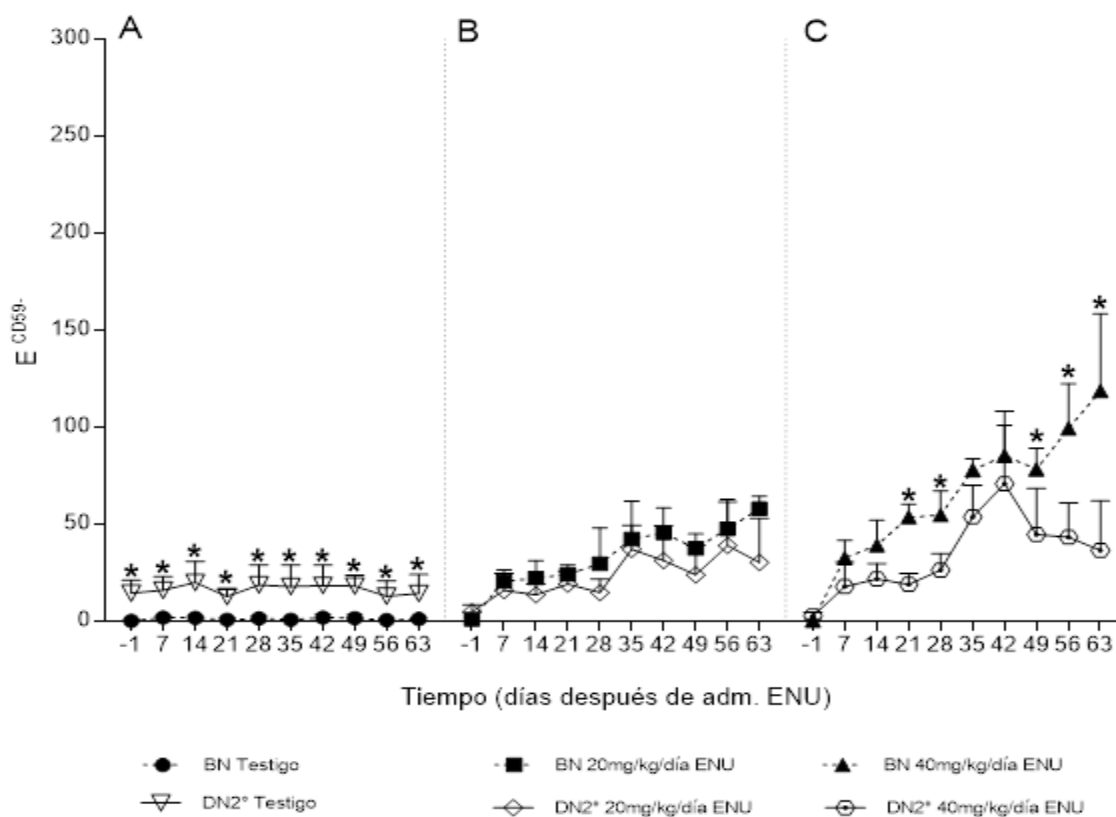


Gráfica 4. Frecuencia de RET ^{CD59-} en ratas DN2° y BN testigo y expuestas a ENU. El promedio y E.E. de la MF en ratas DN2° testigo fue significativamente mayor (*) comparado con las ratas BN en todo momento de muestreo (panel A). Se observa inducción de mutantes con las dos dosis de ENU en RET, sólo se presentaron diferencias significativas al inicio del experimento (paneles B y C) y con la dosis de 40 mg/kg/día ENU (panel C) se observaron diferencias significativas en dos tiempos (42 y 56). * Diferencias significativas entre grupos con DN2° y grupos BN testigos y expuestos a ENU, p≤0,05, n= 6.

8.2.3.2 Frecuencia de E mutantes (E^{CD59-})

Las FM de E^{CD59-} se muestran como el promedio ± E.E. En la **Gráfica 5** los datos se presentan distribuidos en tres categorías de tratamiento: testigo y 20 o 40 mg/kg/día ENU. En el grupo BN testigo oscilaron de 0.7 a 1.6X10⁻⁶ y 14.7 a 14.9X10⁻⁶ en el grupo DN2° (panel A). En ambas poblaciones de estudio, las FM fueron significativamente mayores en los grupos DN2° comparado con los grupos BN testigo durante el monitoreo.

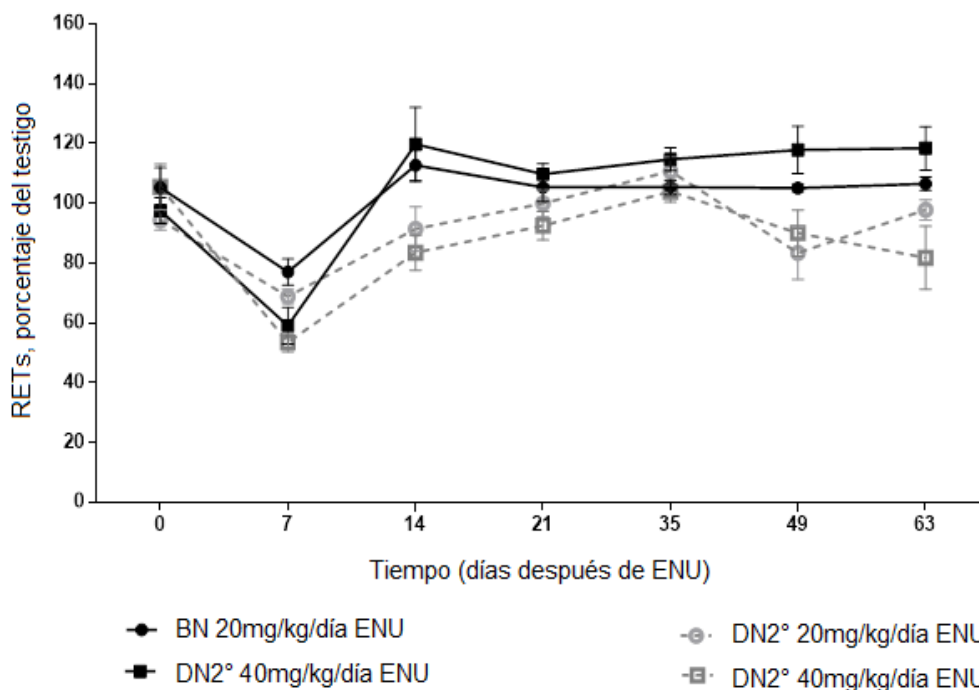
Un aumento similar al observado para las frecuencias de RET^{CD59-} fue encontrado en E^{CD59-} desde el día 7 al día 63 en ratas BN expuestas a ENU. No se presentaron diferencias significativas con la dosis de 20 mg/kg/día (panel B). Se observó un descenso inesperado en la frecuencia E^{CD59-} después del día 42 en el grupo DN2° expuesto a 40 mg/kg/día ENU en comparación con el grupo BN tratado con la misma dosis ENU (panel C).



Gráfica 5. Frecuencia de E^{CD59-} en ratas con DN2° y BN testigo y expuestas a ENU. El promedio y E.E. de la MF en ratas DN2° testigo fue significativamente mayor comparado con las ratas BN en todo momento de muestreo (panel A). La dosis de 20 mg/kg/día ENU mostró inducción de mutantes, pero no se presentaron diferencias significativas (panel B). En el panel C se muestran los grupos expuestos a 40 mg/kg/día ENU.* Diferencias significativas entre grupos con DN2° y grupos BN testigo y con ENU, $p \leq 0,05$, $n = 6$.

8.2.3.3 Porcentaje de RET

El % RET tendió a disminuir en las ratas DN2° expuestas a ENU, pero esta disminución no fue estadísticamente significativa (**Gráfica 6**).



Gráfica 6. Porcentaje de RET en las ratas con DN2° y BN expuestas a ENU con base al testigo. Se presentan promedio y E.E. Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas, $n=6$.

En resumen, las frecuencias RET^{CD59-} y E^{CD59-} registrados en las ratas testigo de los grupos BN y DN2° fueron estables desde el principio hasta el final del periodo de evaluación. Se observó un aumento robusto en las FMs en las ratas DN2° expuestas a ENU, y este aumento persistió durante aproximadamente 9 semanas después de los tres días de exposición. Las FMs fueron mayores en RET^{CD59-} en comparación con E^{CD59-} .

8.3 Efectos de la DN3°

8.3.1 DN 3°: peso corporal

Las ratas con DN3° tuvieron un peso significativamente menor comparado con el peso de los animales BN. Cuando los animales fueron expuestos a TMP-SMX, se observó una disminución en el peso corporal con relación a los grupos testigo. Al comparar con el grupo BN testigo, el peso corporal de las ratas BN expuestas a 50/250 mg TMP-SMX fue significativamente menor en los días -1, 15 y 45, mientras que el peso corporal de las ratas BN tratadas con 100/500 mg TMP-SMX fue significativamente menor en los días 30 y 45. Para el caso de los grupos con DN, se observó una ligera disminución en el peso, con diferencia significativa en el día 30 entre el grupo DN3° 50/250 mg TMP-SMX comparado con el grupo DN3° testigo (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Peso de las ratas BN y DN3° expuestas y no expuestas a TMP-SMX

	BN testigo	BN 50/250 mg TMP-SMX	BN 100/500 mg TMP-SMX
Tiempo	Peso corporal	Peso corporal	Peso corporal
(día)	(g) $\bar{x} \pm E.E.$	(g) $\bar{x} \pm E.E.$	(g) $\bar{x} \pm E.E.$
-1	172.2 ± 6.7	158.9 ± 1.1 a	171.9 ± 5.3
15	226.3 ± 5.5	212.5 ± 3.3 a	219.1 ± 2.6
30	307.6 ± 6.5	303.8 ± 4.9	285.4 ± 3.3 a
45	408.4 ± 5.8	388.7 ± 5.2 a	357.1 ± 4.1 a
	DN3° testigo	DN3° 50/250 mg TMP-SMX	DN3° 100/500 mg TMP-SMX
Tiempo	Peso corporal	Peso corporal	Peso corporal
(día)	(g) $\bar{x} \pm E.E.$	(g) $\bar{x} \pm E.E.$	(g) $\bar{x} \pm E.E.$
-1	88.1 ± 3.4 *	85.5 ± 5.2 *	84.0 ± 11.9 *
15	123.4 ± 4.0 *	121.6 ± 9.5 *	119.4 ± 1.5 *
30	179.1 ± 4.4 *	176.9 ± 3.9 *	155.9 ± 9.7 * b
45	189.9 ± 13.7 *	222.3 ± 4.2 *	192.0 ± 4.1 *

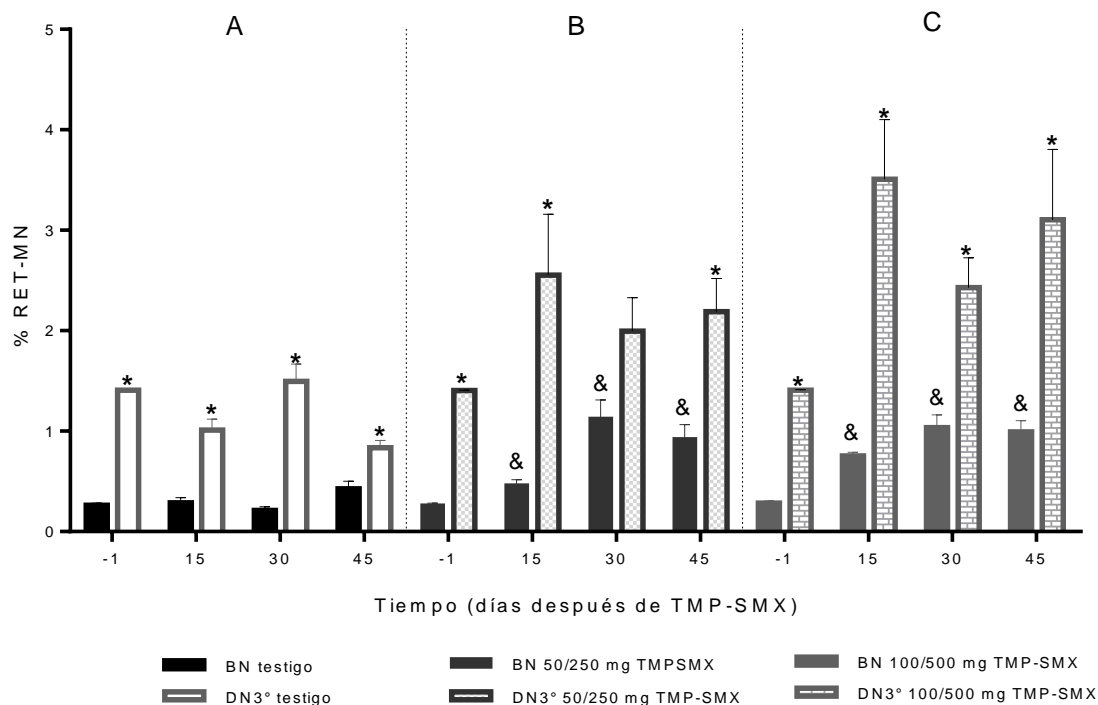
Se presenta el promedio ± error estándar (E.E.). El día -1 corresponde al previo a la administración de TMP-SMX (DE 42). * Diferencias significativas entre el peso de los grupos con DN3° y los grupos BN, expuestas y no expuestas a TMP-SMX, $p \leq 0.05$, $n=6$; **a** diferencias significativas entre grupos BN con 50/250 y 100/500 mg TMP-SMX comparados con el grupo BN testigo, $p \leq 0.05$, $n=6$; **b** diferencias significativas entre los grupos DN3° expuestos a 50/250 y 100/500 mg TMP-SMX comparados con el grupo DN3° testigo, $p \leq 0.05$, $n=6$.

8.3.2 Efecto Genotóxico

8.3.2.1 Porcentaje de RET-MN

Los porcentajes de RET-MN fueron monitoreadas durante 45 días, en la **Gráfica 7**, se presentan las diferencias significativas al momento de comparar los grupos BN y DN3° testigo (sin tratamiento). En el grupo con DN3°, los incrementos en los porcentajes fueron consistentes durante todo el estudio (panel **A**), en el caso de los grupos expuestos a 50/250 mg TMP-SMX se presentaron diferencias significativas en los incrementos de los MN del grupo desnutrido en los días -1, 15 y 45 (panel **B**). El grupo DN3° expuesto a 100/500 mg TMP-SMX presentó diferencias significativas en el aumento de sus porcentajes durante todo el periodo de estudio (panel **C**).

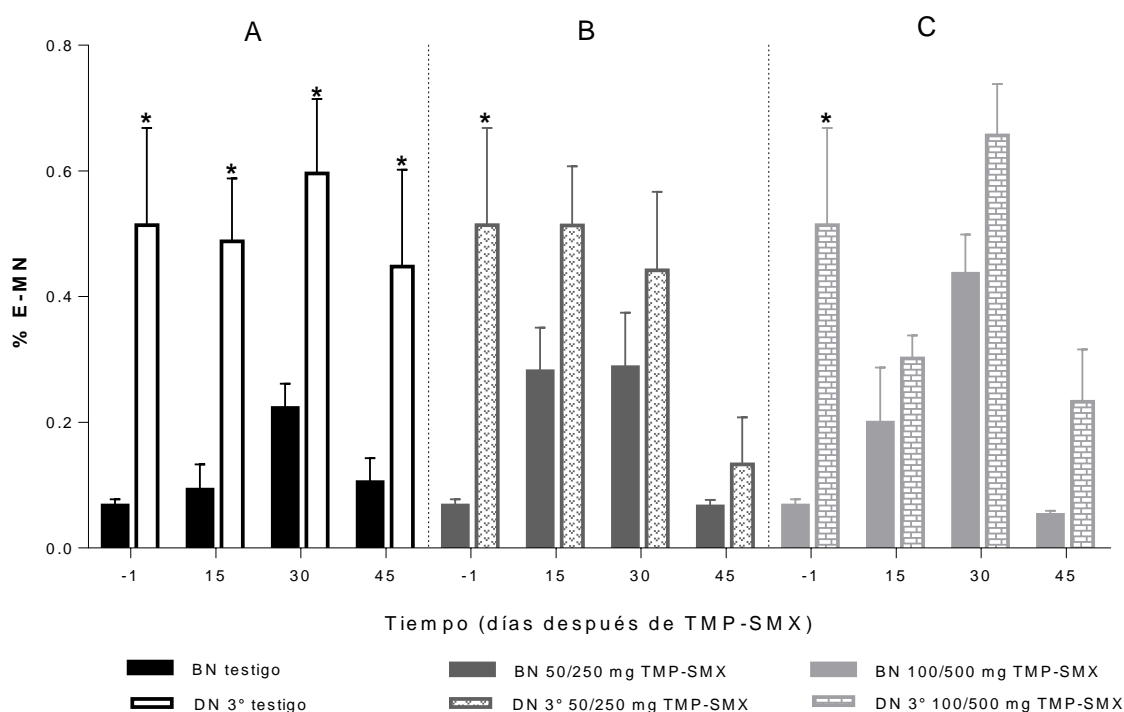
Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de RET-MN en los grupos BN tratados con las dosis de TMP-SMX comparados con el grupo BN testigo. Con ambas dosis (50/250 y 100/500 mg) el porcentaje fue mayor en los días 15, 30 y 45 con diferencias significativas, estos resultados demuestran que con ambas dosis presentan un alto porcentaje de RET-MN, evidenciando el efecto genotóxico en los organismos BN (paneles **B** y **C**).



Gráfica 7. Porcentaje de RET-MN en sangre periférica de ratas bien nutridas y con DN3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX. Se muestra promedio y E.E. Panel **A** se muestran grupos testigo, en el panel **B** se presentan los grupos expuestos a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX y en el panel **C** están los grupos expuestos a 100/500 mg TMP-SMX. * Diferencias significativas entre los grupos BN y DN3° testigo; BN 50/250 mg TMP-SMX y DN3° 50/250 mg TMP-SMX; BN 100/500 mg TMP-SMX y DN3° 100/500 mg TMP-SMX. & Diferencias significativas entre los grupos BN 250/250, 100/500 mg TMP-SMX comparados con el BN testigo. $p \leq 0.05$, $n=6$.

8.3.2.2 Porcentaje de E-MN

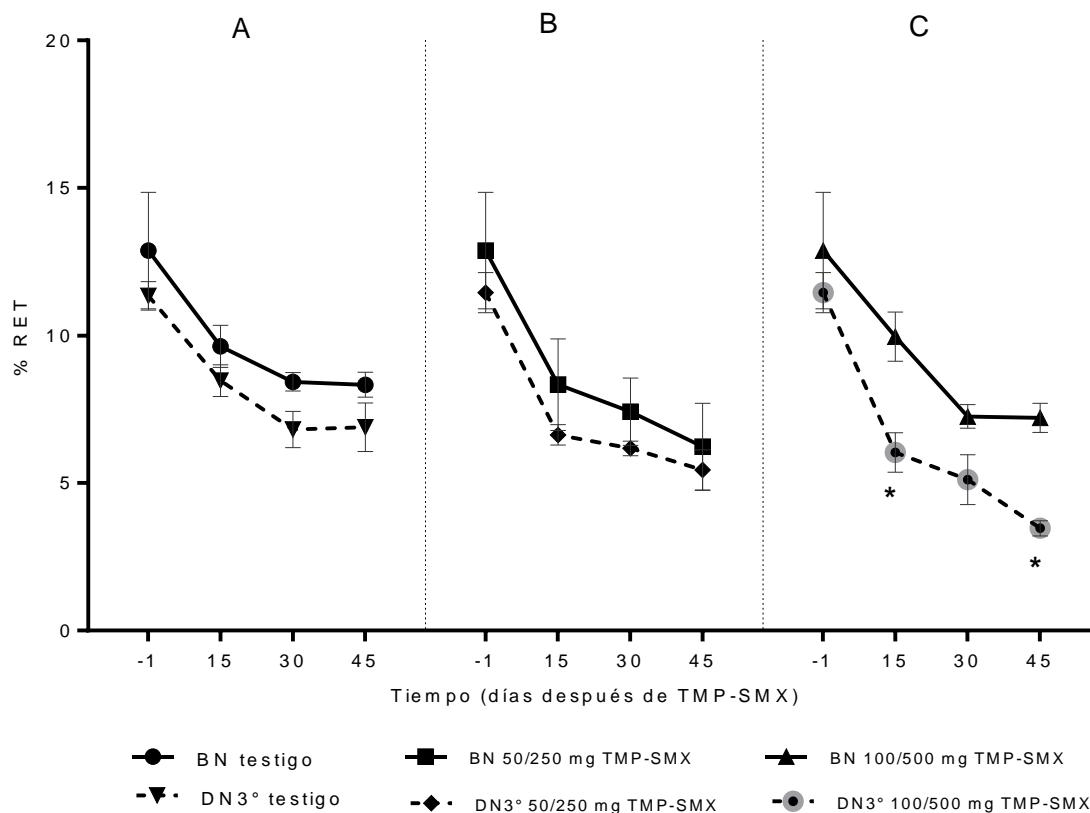
Se presentaron diferencias significativas al momento de comparar los grupos testigo BN y DN3°, los incrementos en los porcentajes en el grupo con DN3° fueron consistentes durante todos los días de estudio (**Gráfica 8: panel A**), en el caso de los grupos expuestos a 50/250 mg TMP-SMX se presentaron diferencias significativas en los incrementos de los porcentajes del grupo desnutrido en el día -1 (panel **B**). El grupo DN3° expuesto a 100/500 mg TMP-SMX presentó diferencias significativas en el día -1 (panel **C**).



Gráfica 8 Porcentaje de E-MN en sangre periférica de ratas bien nutridas y con DN3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX. Se muestra promedio y E.E. Panel **A** se muestran grupos testigo, en el panel **B** se presentan los grupos expuestos a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX y en el panel **C** están los grupos expuestos a 100/500 mg TMP-SMX. * Diferencias significativas entre los grupos BN y DN3°; BN 50/250 mg TMP-SMX y DN3° 50/250 mg TMP-SMX; BN 100/500 mg TMP-SMX y DN3° 100/500 mg TMP-SMX, $p < 0.05$, $n = 6$.

8.3.2.3 Porcentaje de RET

Se evaluó el % de RET en todos los grupos de estudio, en la **Gráfica 9** se muestran el comportamiento los porcentajes de cada uno de los grupos, en el panel **A** se muestra el % RET de los grupos bien nutrido testigo y con DN3° testigo, en el panel **B** se presentan los grupos bien nutridos y con DN3° expuestos a la dosis de 50/250 mg/kg TMP-SMX y en el panel **C** se muestran los grupos expuestos a la dosis de 100/500 mg/kg TMP-SMX. El % RET tendió a disminuir en las ratas con DN3° expuestas a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX, pero esta disminución no fue estadísticamente significativa. Se observaron diferencias significativas en el grupo con DN3° tratado con la dosis de 100/500 mg TMP-SMX en los días 15 y 45.



Gráfica 9. Porcentaje de RET en sangre periférica de ratas bien nutridas y con DN3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX. Se muestra promedio y E.E. Panel **A** se muestran grupos testigo, en el panel **B** se presentan los grupos expuestos a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX y en el panel **C** están los grupos expuestos a 100/500 mg TMP-SMX. * Diferencias significativas entre los BN 100/500 mg TMP-SMX y DN3° 100/500 mg TMP-SMX, $p \leq 0.05$, $n=6$.

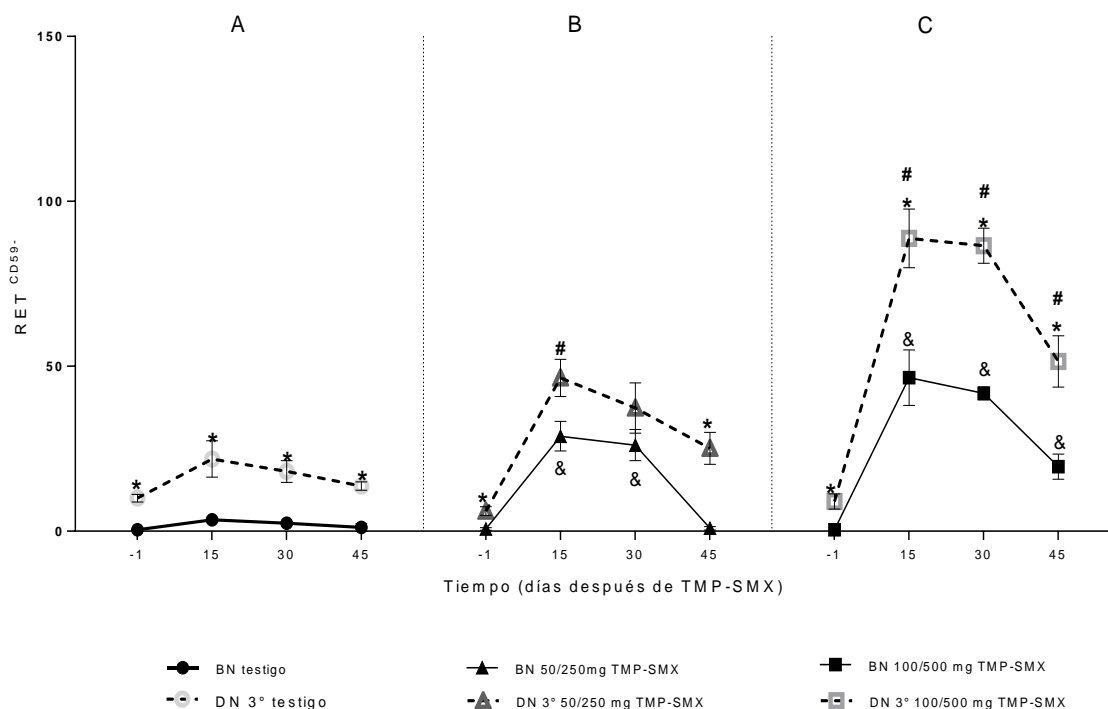
8.3.3 Efecto Mutagénico

8.3.3.1 Frecuencia de RET mutantes (RET^{CD59-})

Las FMs *Pig-a* fueron monitoreadas durante 45 días en RET (**Gráfica 10**) de ratas con DN3° y BN, los resultados se muestran como el promedio \pm E.E. En las gráficas los datos están distribuidos en tres categorías de tratamiento: testigo y 50/250 o 100/500 mg TMP-SMX. En las ratas DN3° testigo, las FMs de RET^{CD59-} fueron consistentemente más altas que el grupo BN testigo (panel **A**).

El grupo con DN3° expuesto a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX presentó diferencias significativas en los días -1 y 45 (panel **B**). La exposición a las dosis de 100/500 mg TMP-SMX aumentó significativamente la FM *Pig-a* en RET en el grupo con DN3° durante todo el periodo de estudio (panel **C**).

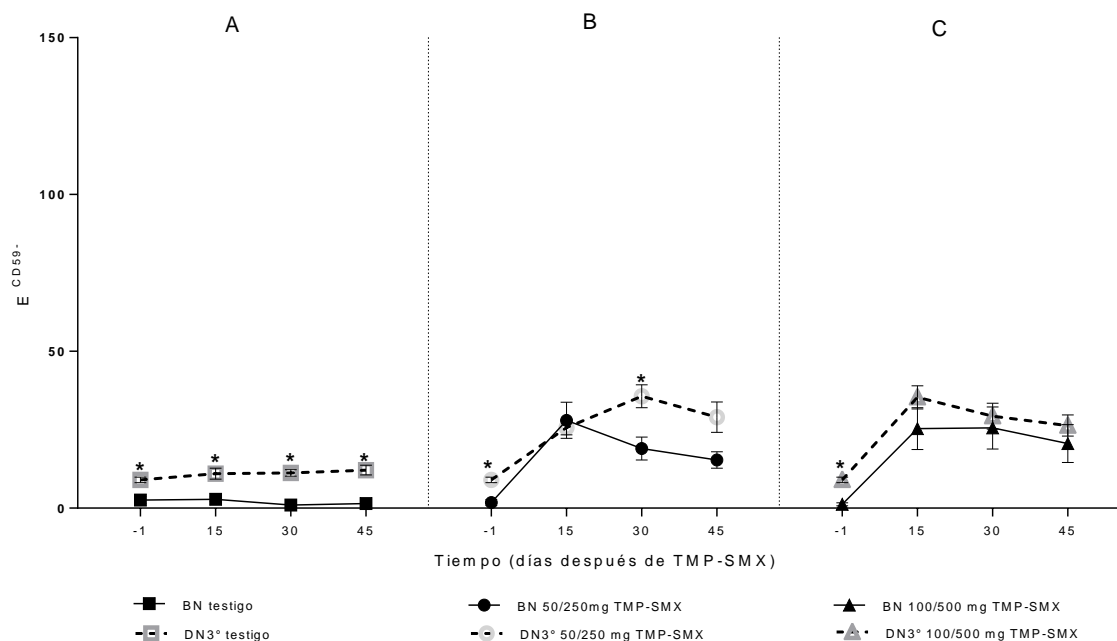
Se presentaron diferencias significativas en la FM de RET^{CD59-} de los grupos tratados con las dosis de TMP-SMX comparados con el grupo BN testigo. La dosis de 50/250 mg tuvo la FM mayor en los días 15 y 30 y con la dosis de 100/500 se presentaron diferencias significativas en los días 15, 30 y 45, estos resultados demuestran que con ambas dosis en los días 15 y 30 se presentó el efecto mutagénico en los grupos BN tratados con el fármaco. Para los grupos desnutridos tratados con las dosis de TMP-SMX comparados con el grupo DN3° testigo se presentó efecto mutagénico con la dosis de 50/250 mg en el día 15 y con la dosis de 100/500 se presentaron diferencias significativas en los días 15, 30 y 45, con base en estos resultados, se demuestra que con ambas dosis en el día 15 hay efecto mutagénico en los grupos con DN3° (paneles **B** y **C**).



Gráfica 10. Frecuencia de RET $CD59^-$ en sangre periférica de ratas bien nutridas y con DN3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX. Se muestra promedio y E.E. Panel **A** se muestran grupos testigo, en el panel **B** se presentan los grupos expuestos a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX y en el panel **C** están los grupos expuestos a 100/500 mg TMP-SMX. * Diferencias significativas entre los grupos BN y DN3°; BN 50/250 mg TMP-SMX y DN3° 50/250 mg TMP-SMX; BN 100/500 mg TMP-SMX y DN2° 100/500 mg TMP-SMX. & Diferencias significativas entre los grupos BN 250/250, BN 100/500 mg TMP-SMX comparados con el BN testigo. # Diferencias significativas entre los grupos DN3° 250/250, DN3° 100/500 mg TMP-SMX comparados con el DN3° testigo, $p \leq 0.05$, $n=6$.

8.3.3.2 Frecuencia de E mutantes (E^{CD59^-})

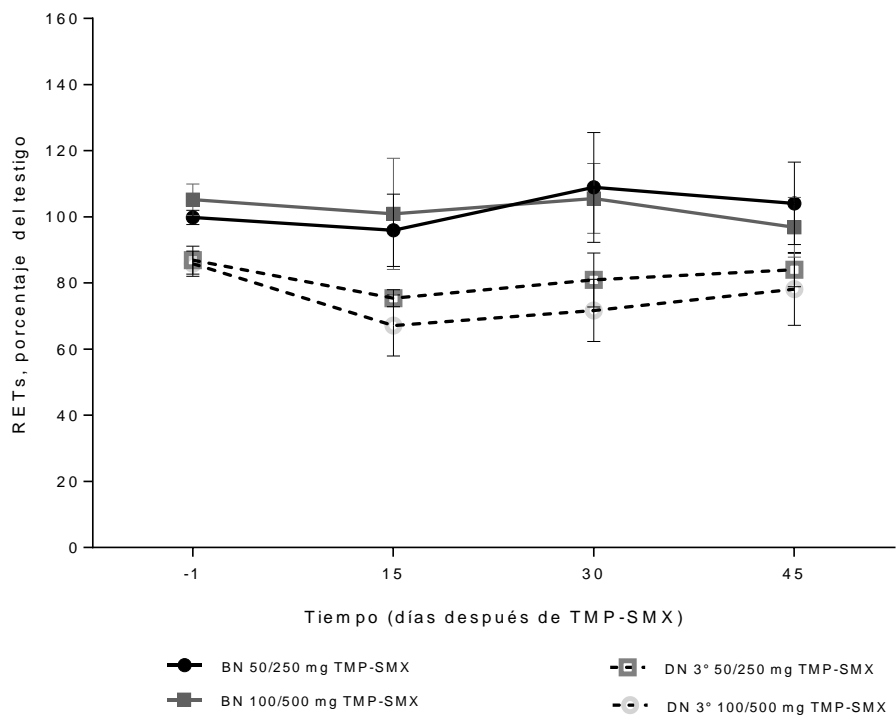
En las ratas DN3° testigo, las FMs de E^{CD59^-} fueron consistentemente más altas que las del grupo BN testigo (**Gráfica 11**, panel **A**). El grupo desnutrido expuesto a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX presentó diferencias significativas en los días -1 y 30 (panel **B**). La exposición a las dosis de 100/500 mg TMP-SMX aumentó la FM *Pig-a* pero no fueron significativos (panel **C**).



Gráfica 11. Frecuencia de E^{CD59-} en sangre periférica de ratas bien nutridas y con DN3° testigo y expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX. Se muestra promedio y E.E. Panel **A** se muestran grupos testigo, en el panel **B** se presentan los grupos expuestos a la dosis de 50/250 mg TMP-SMX y en el panel **C** están los grupos expuestos a 100/500 mg TMP-SMX. * Diferencias significativas entre los grupos BN y DN3°; BN 50/250 mg TMP-SMX y DN3° 50/250 mg TMP-SMX; BN 100/500 mg TMP-SMX y DN3° 100/500 mg TMP-SMX, $p \leq 0.05$, $n=6$.

8.3.3.3 Porcentaje de RET

El % RET tendió a disminuir en las ratas DN3° expuestas a TMP-SMX, pero esta disminución no fue estadísticamente significativa (**Gráfica 12**).

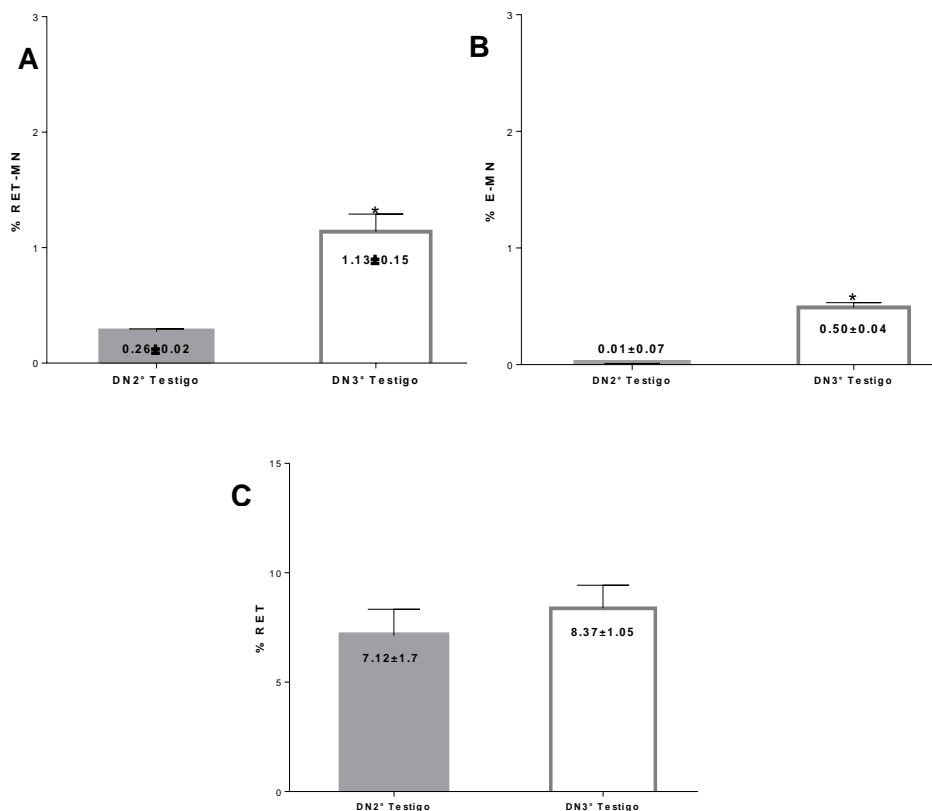


Gráfica 12. Porcentaje de RET en sangre periférica de ratas bien nutridas expuestas y no expuestas a dos dosis de TMP-SMX. Se muestra promedio y E.E. No se observaron diferencias significativas.

8.4 Comparación de los porcentajes y las frecuencias basales acumuladas de ratas testigo, con DN2° y DN3°

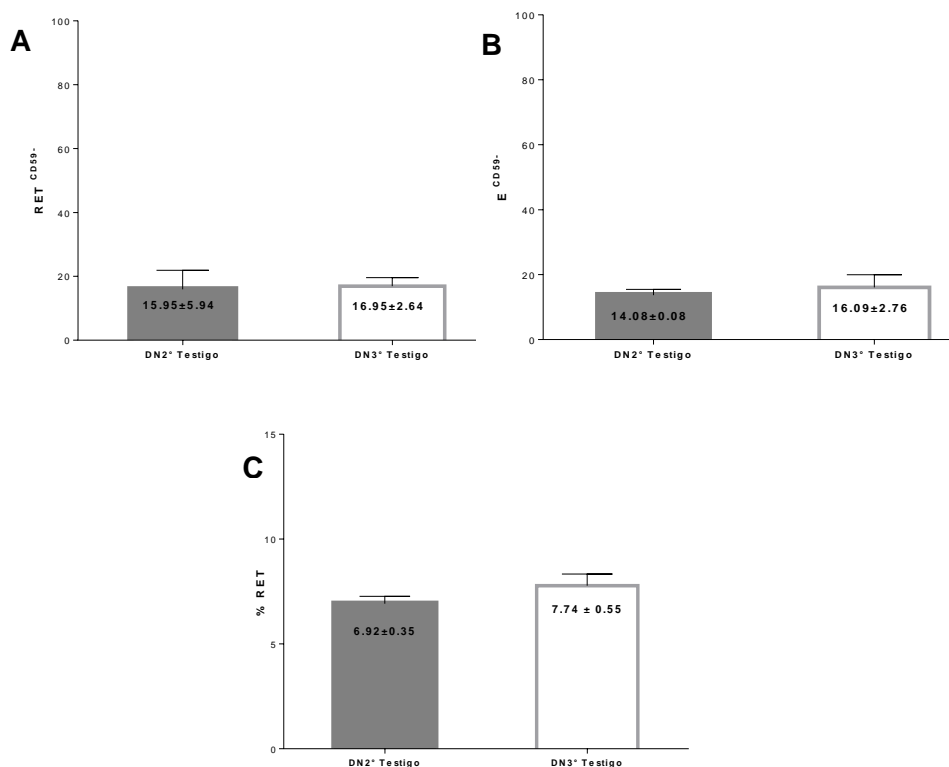
Para el análisis de las diferencias entre los dos grados de DN, se compararon los valores observados en los grupos testigo (sin tratamiento) de ratas DN2° con los DN3°.

Los resultados de los porcentajes basales acumulados de MN y los porcentajes de RET obtenidos en los grupos desnutridos testigos se muestran en la **Gráfica 13**, se presenta el promedio \pm E.E. de los tiempos de muestreo. En el panel **A** se ubica el % RET-MN, la frecuencia muestra incremento en el grupo con DN3° (resultado estadísticamente significativo) al comparar con el porcentaje del grupo con DN2°. En el panel **B** se muestra el % E-MN que fue significativamente mayor en el grupo con DN3° y en el panel **C** se presenta el % RET donde no se presentaron diferencias significativas entre los grados de DN.



Gráfica 13. Porcentajes basales acumulados de MN en sangre periférica de ratas con DN2° y DN3°. Se muestra promedio y E.E. Panel **A**, se presenta % RET-MN, panel **B** se muestra % E-MN y panel **C** el % RET. * Diferencias significativas entre los grupos, $p \leq 0.05$, $n=6$.

Los resultados de las frecuencias basales acumuladas del ensayo *Pig-a* en los grupos desnutridos testigos se presenta en la **Gráfica 14**, se presenta el promedio \pm E.E. de los tiempos de muestreo. En el panel **A** está la frecuencia de RET^{CD59-}. En el panel **B** se muestra la frecuencia de E^{CD59-} y en el panel **C** se presenta el % RET. No se presentaron diferencias significativas entre el grado de DN.



Gráfica 14. Frecuencias basales acumuladas del ensayo *Pig-a* en sangre periférica de ratas con DN2° y DN3°. Se muestra promedio y E.E. Panel **A**, se presenta frecuencia de RET^{CD59-}, panel **B** se muestra la frecuencia de E^{CD59-} y panel **C** el % RET. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Se observaron incrementos significativos en los porcentajes de RET-MN y E-MN en las ratas DN3° con respecto a las DN2°. En cuanto a las frecuencias de RET mutantes (RET^{CD59-}) y E mutantes (E^{CD59-}), las frecuencias obtenidas son similares en ambos grados de DN. En ningún caso se observó diferencia en el porcentaje de RET.

9. Discusión

9.1 Modelo de inducción de desnutrición

La OMS reporta que la DN2° afecta a gran parte de la población pediátrica, estos niños tienen mayor riesgo de muerte porque con facilidad la DN2° puede progresar

hacia la DN3° y por lo tanto los niños presentar trastornos que pueden poner en peligro su vida. Hoy en día la atención de la DN2° debe ser una prioridad de salud pública por su alta prevalencia, por ello es necesario revisar y modificar los protocolos de su manejo, ya que las guías existentes no han sufrido cambios en los últimos 30 años (OMS, 2008).

Los estudios de la DN empleando modelos animales presentan, grandes ventajas, ya que se pueden controlar diversos factores como son las infecciones, el alimento, la exposición a diversos compuestos químicos y las condiciones ambientales. Existen métodos bien establecidos para inducir la DN en ratas durante la lactancia, con base en que los efectos durante esta etapa son determinantes para el desarrollo del individuo. El método de inducción de la DN por de competencia de alimento durante la lactancia ha sido reportado como un método eficiente y altamente reproducible (Medina, 2005). En este trabajo se realizó una modificación después de los 21 días de edad (destete) que consistió en restringir el alimento en un 50 y 75 % a los grupos experimentales, con relación al alimento colocado al lote testigo, de esta forma se registró el peso de los grupos con DN por largos periodos de estudio. Para determinar el grado de DN, se empleó el déficit de peso que ha sido tradicionalmente utilizado como un buen indicador en ratas (Widdowson y McCance, 1975). En nuestros resultados se confirmó que el método de inducción de la DN es un método eficiente incluso cuando se realizan las modificaciones post-destete.

9.2 Efecto genotóxico y mutagénico de la DN2°

9.2.1 Efecto genotóxico

El ensayo de MN es una prueba ampliamente utilizada para la detección de daño genotóxico producido por diferentes agentes químicos y físicos (Heddle et al, 1991). En este trabajo se realizó un seguimiento de los porcentajes de RET-MN y E-MN y el % RET para detectar el efecto genotóxico de la DN2°. Se registraron las respuestas genotóxicas en los organismos BN a la semana de exposición al mutágeno. En el caso de los organismos con DN2° expuestos a ENU, la respuesta se hizo evidente 14 días después de la exposición, ya que los RET-MN fueron mayores en los grupos tratados con las dos dosis de ENU. La DN2° mostró tener efectos genotóxicos al ser comparada con el grupo BN testigo, ya que se incrementaron los porcentajes de MN en los tiempos de estudio. Las respuestas de los grupos BN y DN2° expuestos al mutágeno mostraron efectos significativos comparado con el comportamiento de la respuesta en los grupos testigo, es decir, los porcentajes descendieron en algunos tiempos de estudio. En cuanto al % de RET que es un parámetro que ayuda a la identificación del efecto citotóxico, se observó una tendencia a disminuir en los grupos con DN2°, pero las diferencias no fueron significativas.

9.2.2. Efecto mutagénico

En modelos experimentales, ha sido demostrado que la DN afecta la integridad genética celular. Particularmente en células de ratas desnutridas se han observado niveles bajos de ARN polimerasa, así como un contenido reducido de proteínas, cambios en el ciclo celular y alteraciones en la integridad estructural de

los cromosomas (Garrido et al., 1981; Alu y Murthy, 1994; Gómez et al., 1996). Con la finalidad de determinar si el desequilibrio negativo de nutrientes tiene un efecto sobre la FM, en este trabajo se evaluó el efecto de la DN2° en las FMs basal e inducida utilizando el ensayo de mutación somática en el gen *Pig-a* en RET y E obtenidos de sangre periférica de ratas desnutridas desde la lactancia a la edad adulta. Los resultados indicaron que la frecuencia de RET^{CD59-} basal (observada en las ratas sin tratamiento) fue de 9.6 veces mayor en las ratas con DN2° que en las ratas BN ($13.5 \pm 5.5 \times 10^{-6}$ en el grupo DN2° vs. $1.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ en el grupo BN) en el día -1 y 13.5 veces en el día 79. La FM basal en condiciones de DN2° es similar a la frecuencia inducida por la administración de mutágenos débiles, tales como el tratamiento con 5 mg/kg/día clorambucilo durante 29 días ó 37.5 mg/kg/día sultona 3-propano durante 16 días (Dertinger et al., 2014). En este estudio, se observó que la FM basal en RET de ratas BN fue consistente con lo reportado anteriormente (Miura et al., 2008a; Phonethepswath et al., 2008). Los animales expuestos a ENU en los dos grupos BN y DN2° mostraron aumentos significativos dosis y tiempo dependientes para las frecuencias de RET^{CD59-} y E^{CD59-}.

La DN2° durante el desarrollo temprano y el crecimiento aparentemente afectó a la FM basal en el gen *Pig-a*. Los datos mostraron que la DN2° aumentó el FM espontánea, lo que permite sugerir que puede estar relacionado con un efecto mutagénico en el desbalance de nutrientes (micronutrientes) ya que desempeñan un papel importante en diversas reacciones de mantenimiento del ADN y en la prevención de la inestabilidad genómica (Fenech, 2002). Este efecto fue consistente en todos los días de estudio. Sin embargo, se observó una reducción

de la FM inducida en ratas DN2° en comparación con las ratas BN después de la exposición a ENU.

En los grupos expuestos a 20 mg/kg/día ENU, se observaron aumentos en las frecuencias RET^{CD59-} que fueron similares a la frecuencia reportada por Phonethepswath et al. (2010). Sin embargo, en los grupos expuestos a 40 mg/kg/día ENU, las frecuencias RET^{CD59-} fueron inferiores a los reportados por Phonethepswath et al. (2010). En ambos casos, se observó que la inducción de mutantes fue similar en los grupos BN y DN2°.

Estudios en ratones han demostrado una asociación entre la DN y cambios en el microambiente de la médula ósea que produce alteraciones en la hematopoyesis (Nakajima et al., 2014). Se ha reportado que la DN produce diversos efectos citogenéticos en médula ósea: cambios estructurales, interacciones celulares, así como en las señales de entrada al ciclo celular que afectan a la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas (Veena y Murthy, 1994; Olmos et al., 2001; Nakajima et al., 2014). El aumento en FM *Pig-a* en el grupo DN2° testigo, sugiere que este grupo experimentó niveles más altos ($18.8 \pm 4.1 \times 10^{-6}$) de daño al ADN en comparación con el grupo BN testigo ($1.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$). Como se señaló anteriormente, se esperaba observar una FM mayor en los grupos con DN2° en comparación con los grupos BN tras la exposición a las dosis de ENU. En la médula ósea se requiere de una alta demanda de nutrientes por ser un tejido con proliferación rápida, se renuevan aproximadamente en una semana, por lo que la alta tasa de división celular puede aumentar la probabilidad de que se produzcan errores durante la replicación del ADN, además de hacer que el intervalo de tiempo para reparar estos errores sea más corto (Sun & Heddle, 1999). En el caso

de exposición a ENU, éste actúa mediante la transferencia de su grupo etilo a los átomos de oxígeno y de nitrógeno de las bases de ADN, estos aductos en el ADN no son mutaciones por sí mismos, pero durante la replicación pueden producir error de apareamiento, que en la siguiente ronda de replicación puede causar una mutación (Noveroske et al., 2000; Feitsma et al., 2004), por lo tanto, cuando este tejido es expuesto a ENU, los aductos producidos tendrían mayor probabilidad de inducción de mutaciones porque los tiempos de reparación son menores.

No se cuenta con reportes del efecto de la DN2° en la FM, en este trabajo evaluamos animales con DN2° que fueron expuestos a ENU. Hasta el momento se ha evaluado el efecto de la DN3° en la FM con dosis de ENU de 30 mg/kg de peso/3 días y 60 mg/kg de peso/3 días, se observaron incrementos de la frecuencia de mutantes (Pacheco, 2012), la FM fue mayor en comparación con la FM con DN2°. Por otra parte, se ha mostrado en roedores con DN3° que se presentan alteraciones en el ciclo celular, en los tiempos de proliferación, así como una disminución de “progenitores” eritroides en médula ósea (Borelli et al., 2007; 2009), sin embargo, en la DN2° se observaron descensos en la FM, por lo que se propone que en este grado de DN, las FMs más bajas (aunque no fueron significativas) se pueden deber a mecanismos de reparación, largos periodos de diferenciación y muerte de los mutantes. Se trabajó con animales que presentaban lesiones en el ADN previas (daño al ADN demostrado en diversos estudios con diferentes ensayos) a la exposición a ENU. Cuando los animales sufrieron una segunda lesión (exposición al mutágeno) se pudo potenciar la acción de ENU en la médula ósea previamente alterada por efecto de la DN.

La comprensión de las diferencias entre los efectos de la DN y de mutaciones genéticas espontáneas e inducidas requerirá estudios de seguimiento que examinen los mecanismos responsables de estas respuestas. Estudios de secuenciación de los mutantes presentes en las ratas con DN2° y BN proporcionarían información valiosa con respecto a los mecanismos subyacentes.

De igual manera, es necesario realizar otros estudios en los que se explore la relación entre los niveles de micronutrientes específicos que puedan ser necesarios para la estabilidad del genoma, la reparación del ADN, y la susceptibilidad a mutaciones en el gen *Pig-a*.

En cuanto al % RET, de acuerdo con los resultados reportados por Ortiz, et al. (2011) el porcentaje es menor en las ratas con DN3° que en los testigos. Otros estudios dirigidos por Borelli et al. (2007; 2009) reportan que en ratones desnutridos, se presentaron cambios en la hematopoyesis, estas alteraciones se presentaron como reducción en los porcentajes de progenitores eritroides, así como en periodos prolongados de diferenciación celular. Esto podría indicar que la DN3° se asocia con la supresión de la médula ósea, reduciendo la producción de RET. En este estudio, no se observó una reducción en % RET, la DN2° no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo en ese porcentaje.

Para poder detectar efectos genotóxicos en organismos expuestos, una prueba de estudio no es suficiente. En el caso de los efectos de la DN2° con la combinación de las pruebas genotóxica y mutagénica se observó que este grado de DN produce incrementos en los porcentajes y en las FMs de RET y E y que estas respuestas coinciden en el día 15 y/o en algunos casos en el día 30, por lo tanto los ensayos de MN y *Pig-a* son complementarios.

9.3 Efecto genotóxico y mutagénico de la DN3°

9.3.1 Efecto genotóxico

Los efectos genotóxicos de la DN3° han sido estudiados y reportados con distintas herramientas de estudio, en este trabajo se realizó un monitoreo en periodos largos que no solo evaluaron el efecto de la DN3° post-destete, sino también el efecto de la combinación con antibióticos TMP-SMX, ampliamente utilizados en niños con DN.

Los grupos BN expuestos a las dosis de TMP-SMX presentaron respuestas genotóxicas, ya que se incrementaron los porcentajes de RET-MN. En el caso del grupo con DN3° testigo los efectos genotóxicos fueron significativos los días 15 y 45. Cuando se compararon los efectos entre los grupos BN y DN3° expuestos a los antibióticos, se observó una respuesta consistente en los tiempos de estudio, en particular para los DN3° 50/250 y 100/500 mg de TMP-SMX.

En cuanto a los % RET se presentaron disminuciones en el grupo DN3° con 100/500 mg TMP-SMX pero no significativas, al igual que en los otros grupos DN. Con base en estos resultados se puede sugerir que la dosis de 50/250 mg de TMP-SMX no presenta un efecto citotóxico en las células de los organismos BN y DN3°.

Como se mencionó anteriormente, existe controversia en los reportes de los efectos toxicológicos de TMP-SMX. Ortiz et al. (2011) reportó, que usando la dosis terapéutica de 80/400 mg de TMP-SMX por vía oral, se presentaban incrementos en la frecuencia de MN en ratas con DN3°. En el presente estudio se aplicó una dosis más baja (50/250 mg) y una mas alta (100/500 mg) de TMP-SMX en comparación con el estudio de Ortiz et al (20011), se observó un efecto genotóxico

persistente con la dosis más alta sin embargo, la dosis más baja solo presentó diferencias significativas en el día 45 en las ratas con DN3°.

9.3.2. Efecto mutagénico

Se tiene poca información que demuestre la relación entre la DN con la susceptibilidad génica. El efecto mutagénico fue evidente en la evaluación de las FMs en el grupo con DN3° testigo (sin tratamiento), las frecuencias de RET mutantes (RET^{CD59-}) y E mutantes (E^{CD59-}) fueron significativamente altas y estables, este resultado indica que la DN3° tiene un efecto mutagénico.

No se cuenta con reportes del efecto mutagénico de la combinación de antibióticos TMP-SMX en organismos con DN3°. Cuando las ratas fueron expuestas a la dosis de 100/500 mg TPM-SMX se observó que las frecuencias en RET y E mutantes fueron significativamente altas, con un efecto consistente a lo largo del estudio, evidenciando el efecto mutagénico del TMP-SMX.

En cuanto al % RET se observaron tendencias de disminución en los grupos desnutridos, sin embargo, estos resultados no fueron significativos. Los efectos de la DN3° a nivel genético han sido documentados con modelos experimentales y en humanos, es bien sabido que los organismos con este tipo de DN presentan daño al ADN (Ortiz et al., 2011) y con los resultados obtenidos en este estudio, se observa claramente como este daño altera las frecuencias de mutación, afectando la susceptibilidad genética de los organismos que padecen DN3°.

9.4 Susceptibilidad a daño genético en desnutrición

Estudios citogenéticos han evidenciado el daño en el material genético asociado a la DN. Cortés et al. (2001), demostraron por medio del ensayo cometa, la presencia de altos índices de daño al ADN en bazo, sangre periférica y médula ósea en ratas DN de 21 días de edad. De similar manera, Ortiz et al. (2004), reportaron que en ratas DN tratadas con Mitomicina C, se presentaba un elevado porcentaje de RET-MN evidenciando el daño al ADN. Posteriormente, de manera complementaria se demostró empleando citometría de flujo el incremento de RET-MN en ratas con DN3° (Ortiz et al., 2011). Estos reportes muestran resultados consistentes y reflejan el impacto de la deficiencia grave de nutrientes y su asociación con el daño al ADN.

En este estudio se observaron incrementos en los porcentajes de RET-MN, E-MN y en el aspecto mutagénico se reportan frecuencias elevadas de RET^{CD59-} y E^{CD59-}, estos resultados permiten sugerir que, a nivel génico, la DN2° y DN3° se encuentran asociadas con un incremento de mutaciones somáticas, tomando como indicadores las FMs. Al comparar los efectos genotóxicos y mutagénicos entre los dos grados de DN, se encontró que la DN3° tiene mayor efecto genotóxico en comparación con la DN2°. En cuanto al efecto mutagénico no se observaron diferencias significativas en las FMs entre la DN2° y DN3°. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en el % RET.

En cuanto a la respuesta ante ENU, los grupos de estudio respondieron de acuerdo a la dosis, incrementando las frecuencias de mutantes para ambas poblaciones celulares. Se tienen reportes basados en la capacidad de reparación de aductos en el ADN de rata, se ha propuesto que este proceso se realiza

mediante la actividad de la proteína O (6)-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) (Gerson et al., 1986; Dobo et al., 2011). Esta proteína es clave en la resistencia de células tumorales (Christmann et al., 2010). MGMT, ofrece protección contra la formación de mutaciones de transición como GC → AT inducidas por agentes alquilantes (Lees et al., 2004), se sugiere que este mecanismo sea el que esté reduciendo los daños inducidos por ENU, se propone que este mecanismo esté ocurriendo en las ratas BN con dosis bajas del mutágeno, no obstante, en las ratas desnutridas, este mecanismo sería deficiente debido a los niveles proteicos bajos.

9.5 Ensayos de mutación génica en estudios de desnutrición

Hasta el momento solo dos genes han sido estudiados en modelos de DN, *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, el ensayo *HPRT* se realiza en linfocitos y se emplean cultivos basados en la detección de células resistentes a la 6-tioguanina (mutantes), este ensayo requiere de varios días para la obtención de resultados. Por otro lado, el ensayo *Pig-a* permite evaluar productos y tomar decisiones regulatorias, ya que mide la inducción de mutaciones en un determinado gen en lugar de medir sólo el daño primario en el ADN. Otros análisis de mutación de genes *in vivo* tienen la desventaja de ser costosos y necesitan tiempos prolongados, además de que requieren el uso de animales transgénicos.

Este ensayo se integra fácilmente en los estudios de toxicidad estándar, tiene la ventaja de sustituir el uso de costosos roedores especializados, los resultados se obtienen el mismo día y en cuestión de horas, se puede usar en distintos tipos celulares incluyendo los linfocitos, es un ensayo rentable y práctico y el gen se encuentra localizado en el cromosoma X por lo que hombres y mujeres tienen sólo una copia funcional. A diferencia de los genes autosómicos con dos alelos, sólo se requiere un único evento de mutación para afectar la función del gen y producir el fenotipo característico.

Hasta el momento el ensayo se ha probado ampliamente en células sanguíneas y en líneas celulares linfoblastoides. En el análisis de resultados de estos estudios hay que considerar las características del sistema hematopoyético; ya que a partir de un análisis de células sanguíneas maduras GPI (-), no es posible saber en qué etapa ocurrió la mutación, puesto que se puede producir en una célula troncal hematopoyética multipotencial, o en células progenitoras (Dingli et al., 2008; Miura et al., 2009). En algunos casos, esta situación se puede inferir a partir de la cinética del número de células mutantes: por ejemplo, si después de una sola dosis de mutágeno hay un marcado aumento en la frecuencia de mutantes, y éste se mantiene durante varios meses, es razonable suponer que la mutación ha tenido lugar en una célula troncal hematopoyética (Araten et al., 1999). Este evento originará muchas más células maduras mutantes, que una mutación que ha tenido lugar en un eritroblasto, y esto afectará el recuento de células mutantes en la sangre periférica.

Como en todo ensayo se presentan fortalezas y debilidades del mismo, por lo podemos decir con base en la experiencia adquirida durante el desarrollo de este

proyecto que las fortalezas de este ensayo son: se puede realizar en diferentes especies y tipos celulares, es sensible y detecta frecuencias bajas de mutantes basales ($<5 \times 10^{-6}$ en E y RET de roedores); Los análisis con RET o E, permiten hacer estudios de exposición crónica y subcrónica y dar seguimiento en los mismos animales, por periodos largos de tiempo. En cuanto a las debilidades, podemos mencionar: se requiere de un citómetro de flujo, equipo relativamente caro y experiencia en su uso, los ensayos con leucocitos de roedores requieren sacrificar el animal para obtener un número suficiente de células, los ensayos realizados con E y RET de mamíferos no permiten la caracterización del genotipo. Esta prueba cumple el objetivo principal de las pruebas de reglamentación de toxicidad genética, al evaluar la mutación genética en lugar del daño en el ADN. El estudio basado en el análisis de E y RET por citometría de flujo es rápido, relativamente fácil de realizar, económico y práctico. Se ha evidenciado que puede utilizarse para medir toxicidad crónica y subcrónica sin alterar otros criterios de valoración, como por ejemplo el metabolismo de fármacos (Dertinger et al., 2010). Debido a que la cinética de manifestación de mutantes es relativamente rápida, los análisis llevados a cabo en RET, son los más útiles para la mayoría de las aplicaciones reguladoras.

Un inconveniente al trabajar con eritrocitos de mamíferos es que al carecer de núcleo ya no es posible ubicar la mutación. Por lo anterior se ha propuesto también analizar células nucleadas (Dobrovolsky et al., 2010), o bien, que los resultados de las frecuencias de mutación sean complementados con estudios de secuenciación si es que se desea identificar el tipo de mutación prevalente.

Es necesario seguir trabajando a nivel molecular para relacionar la ausencia de CD59 con los cambios moleculares en el gen *Pig-a*. También es importante evaluar la sensibilidad y especificidad del ensayo, para lo cual se propone probar mutágenos débiles y no mutágenos, así como optimizar el diseño de estos estudios.

El ensayo *Pig-a* tiene diversas versiones, el uso de columnas magnéticas tiene una gran ventaja ya que enriquece el conteo de las células mutantes para ensayos complementarios posteriores, se propone el uso de la secuenciación de mutantes *Pig-a* para poder clasificar e identificar las mutaciones producidas por la DN2° y DN3°.

10. Conclusiones y comentarios finales

Efectos de la DN2° y ENU

1. La DN2° se relaciona con incremento en el porcentaje de RET-MN.
2. La DN2° incrementa la FM basal en RET^{CD59-} y E^{CD59-}.
3. Los animales expuestos a ENU en los dos grupos BN y DN2° mostraron aumentos significativos en las frecuencias inducida de RET^{CD59-} y E^{CD59-}, los cuales resultaron dosis y tiempo dependientes.
4. No se presentó efecto en los porcentajes de RET en los grupos de estudio.

Efectos de la DN3° y TMP-SMX

1. Los grupos BN expuestos a las dosis de TMP-SMX presentaron modificaciones en el porcentaje de RET-MN.

2. En los grupos con DN3° expuestos a las dosis de la combinación de antibióticos, mostraron incrementos del porcentaje de MN a lo largo de los tiempos de estudio, evidenciando el efecto genotóxico en las diferentes condiciones, porcentaje inducido por dos diferentes dosis de TMP-SMX.
3. La DN3° incrementa la FM basal en RET^{CD59-} y E^{CD59-} evidenciando un efecto mutagénico.
4. El efecto de la DN3° y la dosis de 100/500 mg TPM-SMX presentó un efecto constante a lo largo del estudio, demostrando un efecto mutagénico persistente.

Efecto de la DN2° y DN3° en las frecuencias basales de ratas testigo

1. La DN3° tiene mayor efecto genotóxico en comparación con el efecto producido por la DN2°.
2. Se observaron incrementos similares de las FM en la DN2° y DN3°.

Los ensayos de MN y *Pig-a* son complementarios y se pueden llevar a cabo simultáneamente, ya que se optimizan recursos, material biológico y tiempo para la elaboración de los ensayos. Ambas pruebas se realizan en el mismo animal con la misma muestra obtenida, por lo tanto, se cumple con las normas bioéticas del manejo y uso de animales de experimentación al poder combinar los ensayos y poder mejorar y refinar los protocolos de experimentación.

El presente estudio evidencia que el análisis de la mutación en el gen *Pig-a* tiene un alto potencial para el estudio *in vivo* de las tasas de mutaciones somáticas así como su cinética de inducción por diversos agentes y en diferentes condiciones.

Por lo que se considera que es una herramienta adecuada para uso rutinario, integrándose de manera complementaria a otros análisis citogenéticos.

11. Perspectivas

- Realizar estudios de proliferación celular para comprobar si existe un desfase en los ciclos celulares de individuos expuestos a ENU.
- Se propone el análisis de mecanismos de reparación del ADN para poder dilucidar si los descensos de las FMs y porcentajes de MN se deben a procesos de reparación.
- Realizar estudios de secuenciación (Next Generation Sequencing) de mutantes provenientes de ratas con DN para verificar e identificar las mutaciones, esto proporcionaría información valiosa con respecto a los mecanismos subyacentes.
- Evaluar los efectos de las deficiencias de micronutrientes, debido al papel que desempeñan en diversas reacciones de mantenimiento del ADN y en la prevención de la inestabilidad genómica.

12. Referencias Bibliográficas

- Abrevaya X, Carballo M, Mudry M (2007). The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*) *Genetics and Molecular Biology*. 30: 1139-1143.
- Aidoo A, Mittelstaedt R, Bishop M, Lyn-Cook L, Chen Y, Duffy P, Heflich R, (2003). Effect of caloric restriction on Hprt lymphocyte mutation in aging rats. *Mutat. Res.* 527: 57-66.
- Albertini R, Anderson D, Douglas G, Hagmar J, Hemminki K, Merlo F, Nataranja A, Norppa H, Shuker D, Tice R, Waster M, Aitio A (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res.* 463:111-172.
- Alcoba G, Kerac M, Breysse S, Salpeteur C, Galetto-Lacour A, Briend A, Gervaix A (2013). Do Children with Uncomplicated Severe Acute Malnutrition Need Antibiotics? A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 8: e53184.
- Alu V, Murthy B (1993). Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats and in utero upon rehabilitation, *Experientia*. 49: 258-262.
- American Medical Association (1991). *AMA Drug Evaluations Annual 1991*. Chicago, IL: American Medical Association. p. 1723.
- Araten D, 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.

- Barminko J, Reinholt B, Baron M (2015). Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Hema & Imm.*58: 18–29.
- Bailey R, West Jr K, Black R (2015). The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann Nutr Metab.* 66 (suppl 2): 22–33.
- Black E, Allen H, Bhutta A, Caulfield E, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J (2008). Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet.* 371: 243–60.
- Behrman R, Vaughn 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, 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.
- Borelli P, Barros F, Nakajima K, Blatt S, Beutler B, Pereira J, Tsujita M, Favero G, Fock R (2009). Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Braz J Med Biol Res.* 42: 523–530.
- Borelli P, Blatt S, Pereira J, de Maurino B, Tsujita M, de Souza A, Xavier J, Fock R (2007). Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition, *Br J Nutr.* 97: 307–314.

- Brodsky R, Mukhina G, Li S, Nelson K, Chiurazzi P, Buckley J, Borowitz M (2000). Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol.* 3: 459-66.
- Bryce S, Bemis J, Dertinger S (2008). In vivo mutation assay based on the Endogenous Pig-a Locus. *Environ Mol Mutagen.* 49: 256-264.
- Budavari, S (Ed.). The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Rahway, NJ: Merck and Co., Inc., (1989), p. 1407.
- Caignard G, Eva M, van Bruggen R, Eveleigh R, Bourque G, Malo D, Gros P, Vidal S (2014). Mouse ENU Mutagenesis to Understand Immunity to Infection: Methods, Selected Examples, and Perspectives. *Genes*, 5: 887-925.
- Calzada L (1998). Fundamentos fisiopatológicos. Primera edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur A, Arroyo P (2008). Nutriología Médica. 3a. edición. Editorial Iberoamericana y Fundación Mexicana para la Salud. México. pp. 269.
- Chang C, Trehan I, Wang R, Thakwalakwa C, Maleta K, Deitchler M, Manary M (2013). Children Successfully Treated for Moderate Acute Malnutrition Remain at Risk for Malnutrition and Death in the Subsequent Year after Recovery¹⁻⁴. *J. Nutr.* 143: 215-220.
- 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 K (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.
- Cortés-Barberena E, González-Márquez H, Gómez-Olivares JL, Ortiz-Muñiz R (2008). Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T

lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clin Exp Immunol.* 152: 585-592.

- Cortés-Barberena E, Ceballos-Olvera I, González-Márquez H, Ortiz-Muñiz R (2013). Moderate and severe malnutrition alters proliferation of spleen cells in rats. *Cell Proliferation.* 46:164-171.
- De la Rosa D y Ruiz L (1997). Mutagénesis y carcinogénesis ambiental. pp. 81–92. México.
- Dertinger S, Torous D, Tometsko K (1996). Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat Res* 371: 283-292.
- Dertinger S, Tourus D, Hall N, Tometsko C, Gasiewicz T (2000). Malaria-infected erythrocytes serve as biological standards to ensure reliable and consistent scoring of micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Mutat. Res.* 464: 195-200.
- Dertinger S, Tourus D, Hall N, Murante F, Gleason S, Miller R, Tometsko C (2002). Enumeration of micronucleated CD71-positive human reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat. Res.* 515: 3-14.
- Dertinger S, Phonethepswath S, Franklin D, Weller P, Torous D, Bryce S, Avlasevich S, Bemis J, Hyrien O, Palis J, MacGregor J (2010). Integration of mutation and chromosomal damage endpoints into 28-day repeat dose toxicology studies. *Toxicol. Sci.* 115: 401-411.
- Dertinger S, Torous D, Hayashi M, MacGregor J (2011a). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage. *Mutagenesis.* 26: 139–145.

- Dertinger S, Phonethepswath S, Weller P, Avlasevich S, Torous K, Mereness J, Bryce S, Bemis J, Bell S, Portugal S, Aylott M, MacGregor J (2011b). 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, Phonethepswath S, Avlasevich S, Torous D, Mereness J, Cottom J, Bemis J, Macgregor J (2014). Pig-a gene mutation and micronucleated reticulocyte induction in rats exposed to tumorigenic doses of the leukemogenic agents chlorambucil, thiotepa, melphalan, and 1,3-propane sultone, *Environ. Mol. Mutagen.* 55: 299-308.
- Dingli D, Luzzatto L, Pacheco J (2008). Neutral evolution in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 18496-18500.
- 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. *Mutat Res.* 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 V, Shaddock J, Mittelstaedt R, Manjanatha M, Miura D, Uchikawa M, Mattison D, Morris S (2008). Evaluation of *Macaca mulatta* as a model for genotoxicity studies. *Mutat Res.* 673: 21–28.
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2012). *Inst Nac Sal Pub.* 83-95.
- Fenech M (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 455: 81-95.

- Fenech M (2002). Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs), *Food Chem. Toxicol.* 40: 1113-1117.
- Ferguson M (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci.* 17: 2799-809
- Frenk S (1989). Adaptación metabólica en la desnutrición. Cuadernos de nutrición. 12: 17-32.
- Garrido F, Oliva P, Perretta M (1981). Activity of RNA polymerase in isolated nuclei of liver, spleen and bone marrow of rats with experimental protein and protein-calorie malnutrition, *Rev. Chil. Nutr.* 9: 7-26.
- 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.
- Genetics Home Reference (2013). National Library of Medicine's Genetics Home Reference:
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIGA> 17/11/2013.
- Genetics Home Reference (2016). National Library of Medicine's Genetics Home Reference:
<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/genemutation>.
- Gilman A, Rall T, Nies A, Taylor P (Eds.). Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. New York, NY. Pergamon Press, 1990, p. 1055.
- Gómez F (1946). Desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 3: 543-551.

- Gómez F, Ramos-Galván R, Frenk S, Cravioto J M, Chávez R, Gómez F (2003). Desnutrición y Salud Pública de México. 45: S576-S582.
- Gómez J, Campos C, Rangel P, Ortiz R (1996). Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. *Mutat. Res.* 352: 57-60.
- Golden N (2002). The development of concepts of malnutrition. *Am Soc for Nutrit Sci.* 2117S-2122S.
- González-Mendoza M, Vicuña-Fernández N, Naranjo R, Mora J, Marquez J L, y García G (2002). Efectos de la desnutrición aguda sobre el metabolismo del acetaminofén. *Rev Fac Farm.* 44: 7- 13.
- Goshima G, Kiyomitsu T, Yoda K, Yanagida M (2003). Human centromere chromatin protein hMis12 essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol.* 160: 25-39.
- Goth R, Rajewsky M (1974). Persistence of 06-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. 7a. 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.

- Heddle J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, McGregor J (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutag.* 18: 277-291.
- Hernández P, Almeida J, Orfao A. (2008). Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clin.* 131: 617-30.
- Ho J, Juurlink D (2011). Considerations when prescribing trimethoprim–sulfamethoxazole. *CMAJ*, 16: 1851-1858.
- 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.
- Kinoshita T, Ohishi K, Takeda J (1997). GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *J Biochem.* 2: 251-7.
- Kinoshita T, Fujita M, Maeda Y (2008). Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J Biochem.* 3: 287-94.
- Krawinkel M (2003). Kwashiorkor is still not fully understood. *Bull WHO.* 81: 910-911.

- Kumar S, Ganesh K, Vishnu B, Premarajan K, Sarkar S, Roy G, Nitin J (2015). Malnutrition among under-five children in India and strategies for control. *J Nat Sci Biol Med.* 6(1): 18–23.
- 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 T, by N-methyl-N- and N-ethyl-Nitrosourea. *Mutat Res.* 7: 1-12.
- Lozoff B, Smith J, Kaciroti N, et al (2013) Functional significance of early-life iron deficiency: outcomes at 25 years. *J Pediatr.* 163: 1260–1266.
- 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.
- McLean E, de Benoist B, Allen LH (2008). Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr Bull.* 29(2 suppl): S38–S51.
- 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, 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.
 - Miura D, Dobrovolsky V, Kimoto T, Kasahara Y, Heflich R. (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. *Mutat Res*. 677: 86–92.
 - Murli H. 2003. Screening Assay for Chromosomal Aberrations in CHO Cells with Argentin 23. Final Report in Covance 24742-0-437 SC 2003 Natural Immunogenics Corporation. Covance Laboratories Inc. 9200 Virginia, USA 08 April 2003. pp 1-15.
 - Murthy B, Rahiman A (1994). Chromosomal abnormalities in severely malnourished Indian children. *Hiroshima J. Med. Sci*. 32: 291-294.
 - Nájera O, González C, Betancourt M, Ortiz R (2001). Malnutrition in Mexico: revision of government programme and the diagnostic studies of national reach. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 58: 120–33.
 - Nakajima K, Crisma A, Silva G, Rogero M, Fock R, Borelli P (2014). Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation, *Nutrition*. 30: 82-89.

- 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: 13675-13680.
- Noveroske J, Weber J, Justice M (2000). The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm Genome.*11: 478–483.
- Olmos S, Reinoso M, Marquez M, Roux M (2001). Cytogenetic studies in bone marrow cells from Wistar rats in protein malnutrition. *Metabolism.* 50: 1025-1029.
- OMS (2008). Indicadores para evaluar las prácticas de alimentación del lactante y del niño pequeño Conclusiones de la reunión de consenso llevada a cabo 6 al 8 de noviembre de 2007 en Washington, DC, EE.UU. ISBN: 978 92 4 359666 2.
- 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.
- Pacheco M. (2012). Detección de mutación somática *Pig-a* en eritrocitos de sangre periférica de ratas desnutridas. Tesis de Maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México, D.F. 73 pp.
- Pacheco M, Cervantes E, García MC, Ortiz R (2014). El gen *Pig-a* como indicador de mutaciones somáticas *In vivo*. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 30: 53-65.
- Padula G, Seoane A (2008). Chromosomal effects of infections in malnourished and eutrophic children of Gran La Plata. *BAG, J. basic appl. genet.* 19: 15-20.
- 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, Schroeder D, Habicht J (1994). A methodology for estimating the contribution of malnutrition to child mortality in developing countries. *J Nutr.* 124: S2106–22.
- 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. *Mutat Res.* 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.
- Phonetheswath S, Bryce S, Bemis J, Dertinger S (2008). Erythrocyte based Pig-a gene mutation assay: Demonstration of cross species potential. *Mutat Res.* 657: 122–126.
- Phonetheswath 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.

- Rivera J, Irizarry L, González-de Cossío T (2009). Overview of the Nutritional status of the Mexican population in the last two decades. *Special Article. Salud Publica Mex.* 51 suppl 4.
- Rodriguez 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.
- Rodriguez L, Gonzalez C, Flores L, Jimenez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R (2005). Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12: 502–7.
- Rosse W (1997). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine (Baltimore).* 76: 63-93.
- 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.
- Shima N, Swiger R, Heddle J (2000). Dietary restriction during murine development provides protection against MNU-induced mutations. *Mutat. Res.* 470: 189-200.
- Singer B, Dosanjh M (1990). Site-directed mutagenesis for quantitation of base-base interactions at defined sites. *Mutat 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.
- Sullivan B, Blower M, Karpen G (2001). Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nature.* 2: 584-596.
- Sun B & Heddle J A (1999). The relationship between mutant frequency and time in vivo: simple predictions for any tissue, cell type, or mutagen. *Mutat Res.* 425: 179–183.
- 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.
- Torun V, Viteri F E (2002). Desnutrición Calórico-Proteica. En *Nutrición en Salud y Enfermedad*. Shils, 9ª Edición. México. McGraw-Hill, p. p. 1103-34.
- Torous D, Hall N, Murante F, Gleason S, Tometsko C, Dertinger S (2003). Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy. *Toxicol Sci.* 74: 309–314.
- US Pharmacopeial Convention (1992). US Pharmacopeia Dispensing Information (USP DI); Drug Information for the Health Care Professional 12th ed, V.IB p.2522.

- 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. *Mutat Res.* 231: 55-62.
- Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R (1990). The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 244: 95-103.
- Vega L (1999). Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteico-energética. *Salud Púb de Méx.* 41: 328-333.
- Veena P, Murthy B (1994). Sister-chromatid exchange frequency is elevated and cell proliferation is delayed in bone marrow cells of starved and marginally malnourished rats. *Mutat. Res.* 341: 101-108.
- Werner D & Bower B (1984). Aprendiendo a promover la salud. Palo Alto, Fundación Esperion, p. 484.
- 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.
- 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.

13. Publicaciones generadas en este trabajo

Título: Moderate malnutrition in rats induces somatic gene mutations.

Autores: Pacheco-Martínez MM, Cortés-Barberena E, Cervantes-Ríos E, García-Rodríguez MC, Rodríguez-Cruz L, Ortiz-Muñiz R.

Revista: Mutation Research. 789 (2016), 26–32.

Título: El gen *Pig-a* como indicador de mutaciones somáticas *in vivo*.

Autores: Pacheco-Martínez MM, Cervantes-Ríos E, García-Rodríguez MC, Rodríguez-Cruz L, Ortiz-Muñiz R.

Revista: Rev. Int. Contam. Ambie. 30 (2014), 53-65.

13.1 Publicaciones generadas de la estancia de Investigación

Las siguientes publicaciones se obtuvieron de la colaboración que se realizó en una estancia de investigación (con una duración de 6 meses) en ***Division of Genetic and Molecular Toxicology (DGMT)*** con los Drs. Vasily Dobrovolsky y Robert Heflich del ***National Center for Toxicological Research NCTR/FDA*** Little Rock, Arkansas, Estados Unidos.

Título: CD48-deficient T-lymphocytes from DMBA-treated rats have de novo mutations in the endogenous *Pig-a* gene.

Autores: Dobrovolsky VN, Revollo J, Pearce MG, Pacheco-Martinez MM, Lin H.

Revista: Environmental and Molecular Mutagenesis. 8 (2015), 674–683.

Título: In vivo genotoxicity assessment of acrylamide and glycidyl-methacrylate.

Autores: Dobrovolsky VN, Pacheco-Martinez MM, McDaniel P, Pearce MP, Ding W.

Revista: Food and Chemical Toxicology. 87 (2016), 120–127.

Título: Mutation Analysis with random DNA Identifiers (MARDI) Catalogs *Pig-a* mutations in heterogeneous pools of CD48-Deficient T cells derived from DMBA-treated rats.

Autores: Revollo JR, Crabtree NM, Pearce MG, Pacheco-Martinez MM, Dobrovolsky VN.

Revista: Environmental and Molecular Mutagenesis. 57 (2016), 114-124.



Moderate malnutrition in rats induces somatic gene mutations



M. Monserrat Pacheco-Martínez^{a,c}, Edith Cortés-Barberena^a, Elsa Cervantes-Ríos^a,
María del Carmen García-Rodríguez^b, Leonor Rodríguez-Cruz^a, Rocío Ortiz-Muñoz^{a,*}

^a Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340 México D.F., México

^b Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, A.P. 9-020, México D.F., México

^c Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Avenida San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340 México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2015

Received in revised form 7 January 2016

Accepted 30 January 2016

Available online 8 March 2016

Keywords:

Malnutrition

Mutagenesis

Reticulocytes

Erythrocytes

Pig-a assay

ABSTRACT

The relationship between malnutrition and genetic damage has been widely studied in human and animal models, leading to the observation that interactions between genotoxic exposure and micronutrient status appear to affect genomic stability. A new assay has been developed that uses the phosphatidylinositol glycan class A gene (*Pig-a*) as a reporter for measuring *in vivo* gene mutation. The *Pig-a* assay can be employed to evaluate mutant frequencies (MFs) in peripheral blood reticulocytes (RETs) and erythrocytes (RBCs) using flow cytometry. In the present study, we assessed the effects of malnutrition on mutagenic susceptibility by exposing undernourished (UN) and well-nourished (WN) rats to *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) and measuring *Pig-a* MFs. Two week-old UN and WN male Han-Wistar rats were treated daily with 0, 20, or 40 mg/kg ENU for 3 consecutive days. Blood was collected from the tail vein one day before ENU treatment (Day-1) and after ENU administration on Days 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63. *Pig-a* MFs were measured in RETs and RBCs as the RET^{CD59⁻} and RBC^{CD59⁻} frequencies. In the vehicle control groups, the frequencies of mutant RETs and RBCs were significantly higher in UN rats compared with WN rats at all sampling times. The ENU treatments increased RET and RBC MFs starting at Day 7. Although ENU-induced *Pig-a* MFs were consistently lower in UN rats than in WN rats, these differences were not significant. To understand these responses, further studies should use other mutagens and nucleated surrogate cells and examine the types of mutations induced in UN and WN rats.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Poor intake of nutrients by an organism may result in an active pathological condition known as malnutrition, with different degrees and manifestations; malnutrition is defined as an inadequate intake of nutrients [1,2]. Malnutrition is a leading cause worldwide of mortality among children less than 5 years old [3,4].

There are a large number of *in vivo* and *in vitro* genetic toxicology assays designed to monitor the various effects that physical and chemical agents have on the genetic integrity of cells and the possible risks they pose for an organism [5–8]. These procedures include measurements of DNA-associated proteins and gene-specific mutations (i.e., heritable alterations in the DNA sequence) [5].

* Corresponding author.

E-mail addresses: mon.pach13@gmail.com (M.M. Pacheco-Martínez), cobe@xanum.uam.mx (E. Cortés-Barberena), elsi.cervantes@hotmail.com (E. Cervantes-Ríos), carmen.garcia@unam.mx (M. del Carmen García-Rodríguez), leor@xanum.uam.mx (L. Rodríguez-Cruz), arom@xanum.uam.mx (R. Ortiz-Muñoz).

Studies have detected increased genetic damage in malnourished humans and animal models, as measured based on sister chromatid exchange, chromosomal aberrations, DNA damage determined through single-cell electrophoresis (i.e., comet assay), and the percentage of peripheral blood reticulocytes (RETs) with micronuclei [9–12]. For instance, we have observed significant increases in the micronucleus (MN) frequency in RETs from the peripheral blood of malnourished (UN) rats compared with well-nourished (WN) rats [10]. Increases in DNA damage have also been detected in the peripheral blood lymphocytes of malnourished children [13–15]. Although these previous experiments have focused on the measurement of DNA damage and cytogenetic endpoints, these studies indicate that malnourishment produces DNA damage *in vivo* and that this damage can have negative effects on the developing organism [16].

For the evaluation and monitoring of *in vivo* gene mutations in experimental animals, the *Pig-a* assay is an effective tool for identifying compounds with a potential health risk [17–20]. The mutation reporter employed in this assay is the endogenous X-linked phosphatidylinositol glycan class A gene (*Pig-a*). The product of the *Pig-a*

gene is implicated in an early step in the biosynthesis of glycosyl phosphatidyl inositol (GPI), an anchor that tethers a number of tissue-specific protein markers to the mammalian cell surface [21]. An inactivating mutation in the single functional copy of the *Pig-a* gene results in a cell that is deficient in GPI anchors and, consequently, deficient in GPI-anchored surface markers; these mutants can be enumerated using flow cytometry. Several versions of the rodent *Pig-a* assay had been described [17–20]. In one version, the frequency of mutant cells among total red blood cells (RBCs) and RETs is determined. The RET population is the youngest cohort of RBCs, and following treatment with a test agent, the frequency of mutant RETs relays mutagenicity information earlier than mature RBCs [19]. In another version of the *Pig-a* assay, mutants are enumerated among total RBCs, but with positive identification of target cells using a relatively simple protocol. This version of the assay requires no gradient centrifugation of whole blood to remove leukocytes and no fluorescence compensation adjustments for flow cytometry [20]. Another high-throughput version of the assay was developed involving immunomagnetic enrichment of mutant RBCs and RETs [18].

In this study, we experimentally induced malnutrition in rats via food competition and measured the spontaneous mutant frequency (MF) as well as the MFs induced by the potent mutagen *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) using a standard version of the *Pig-a* assay (no immunomagnetic enrichment) [19].

2. Materials and methods

2.1. Reagents

ENU (CAS no. 759-73-9) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ca^{2+} and Mg^{2+} free phosphate-buffered saline (PBS) was obtained from MicroLab (Mexico City, Mexico). A mouse anti-rat CD59-PE antibody (cat. no. 562106) was procured from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), and the nucleic acid stain SYTO 13 (cat. no. S-7575) was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

2.2. Animals and diets

All experiments were performed according to the guidelines of the Universidad Autonoma Metropolitana (UAM), Official Mexican Guidelines (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) and the National Institutes of Health (NIH). Han-Wistar rats were raised at the Bioterio of the Universidad Autonoma Metropolitana Campus Iztapalapa in Mexico City, Mexico. All animals were housed in conventional animal rooms and maintained under a 12-h light/dark cycle. Nursing mothers were fed with a balanced diet for rodents (TEKLAD GLOBAL, Brentwood, MO, USA) and provided with filtered water *ad libitum*.

2.3. Experimental postnatal malnutrition

Experimental postnatal malnutrition was induced via food competition [22]. One-day-old rats from different litters were randomly assigned to either the experimental malnourished group (UN) or the control WN group. In the WN group, 6–8 female and male pups were fed by each nursing mother, whereas in the UN group, 16 pups were placed with each nursing mother. WN and UN pups were selected from different litters. Categories of malnutrition were established based on the deficit in the weight of the UN rats compared with the weight of the WN rats. Moderate malnutrition or second-degree malnutrition was defined as a weight deficit of 25–40%, and moderately malnourished pups were selected for use in the study. The pups were maintained with nursing mothers for 21 days after birth (weaning) [23].

2.4. Experimental post-weaning malnutrition

To maintain moderate malnutrition after weaning, rats assigned to the WN and UN groups received a diet of either normoproteic food (18% protein, TEKLAD GLOBAL) or hypoproteic food through 50% food restriction. We determined the limit of food to be consumed by the animals by previously by tracking the food consumed by these rats; based on the food consumed by well-nourished animals, we weighed out the food to be malnourished rats according to 50% restriction of the amount of food consumed by well-nourished animals. Nutritional status was assessed by comparing variations in body mass [24] and was evaluated for ten weeks.

2.5. Animal treatment and blood collection

On each day of dosing, ENU was prepared fresh in PBS adjusted to pH 6.1. The animals were weighed before dosing and were divided into treatment groups, with 6 animals/group. Two-week-old (post-natal day (PND) 14) rats were treated with 0, 20 or 40 mg/kg of ENU for 3 consecutive days (PNDs 14–16), with a dosage volume of 10 mL/kg body weight.

On Days—1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, and 63, blood samples of 30 μL were collected through tail vein bleeding and mixed with 100 μL of heparin solution (500 U/mL PBS). The blood collected at each time point was used to conduct the RET/RBC *Pig-a* assay. On each sampling day, an additional 30 μL of blood was collected from one of the vehicle control animals and used to prepare an instrument calibration standard (ICS).

2.6. Sample processing and cell staining

The samples were processed according to the procedure described by Phonethepswath et al. [25], except for the leukodepletion step because we used FL1-H vs FSC-H gating to restrict the analyses to erythrocytes. When this strategy was reported by these authors, they noted that this gating procedure excludes any platelets and leukocytes that may remain after the leukodepletion step. The *Pig-a* assay was conducted on the same day that blood was collected. Each diluted blood sample (130 μL) was added to 155 μL of PBS, then re-suspended via gentle pipetting and centrifuged at 800 g for 5 min; the supernatant was subsequently removed, and another 155 μL of PBS was added with gentle mixing.

Then, 150 μL of this suspension was added to a polypropylene tube containing 100 μL of the following mixture: 3 parts anti-CD59-PE (antibody against CD59 conjugated to phycoerythrin (PE), used to detect mutations based on deficiency in the expression of this protein) and 17 parts PBS +2% v/v fetal bovine serum.

The samples were subsequently incubated on ice for 30 min, followed by two 5 min washes with 1 mL of PBS at 800 g. Next, the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS containing 150 nM SYTO 13, followed by incubation at 37 °C for 30 min. The SYTO-labeled samples were kept on ice until flow cytometric analysis. Flow cytometric analysis was conducted using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) running CellQuest™ Pro version 3.0.1 software for data acquisition and analysis (BD Biosciences). Data were acquired scoring 1.5×10^6 RBCs/sample. For the analysis of RETs, 0.5 mL of SYTO 13 was added before the acquisition of each sample; we analyzed 0.3×10^6 RETs and calculated the mutants per million RETs.

On each experimental day, an instrument calibration standard (ICS) was prepared by mixing approximately 50% cells from control rats that were not exposed to ENU (labeled with CD59-PE and SYTO 13) and 50% mutant-mimic cells (cells labeled with SYTO 13 only) Fig. 1. The ICS was used to optimize the photo-multiplier tube voltage, to set fluorescence compensation and to define the vertical

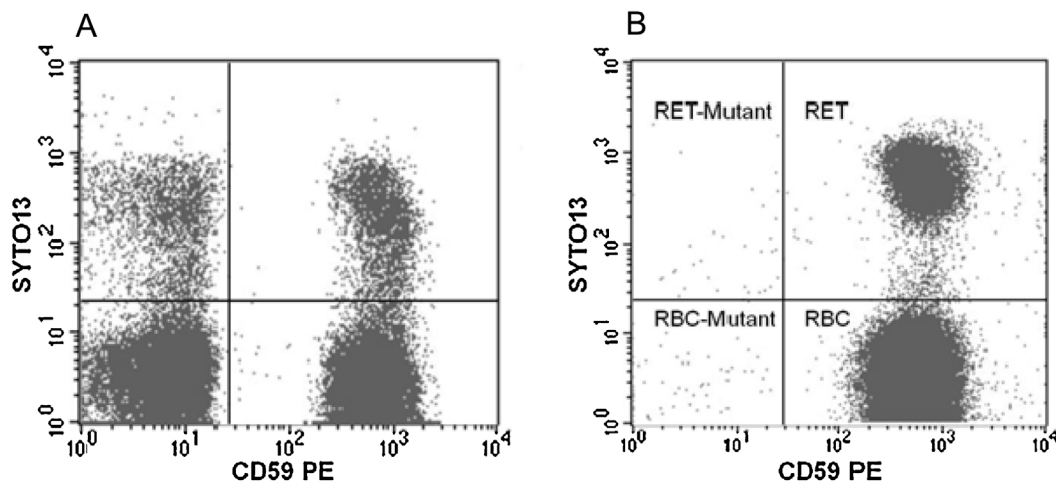


Fig. 1. A presents the ICS used to identify RETs and NCEs. B shows the labeling. SYTO 13+/CD59+: reticulocytes (RET); SYTO 13+/CD59-: mutant reticulocytes (RET-Mutant); SYTO 13-/CD59+: normochromatic erythrocytes (RBC) and SYTO 13-/CD59-: normochromatic mutant erythrocytes (RBC-Mutant).

demarcation line employed to distinguish mutant total RBCs and/or RETs (CD59-negative) from wild-type (CD59-positive) events.

2.7. Statistical analyses

Body weight is expressed as the mean \pm standard deviation, and MFs are expressed as the mean and standard error obtained for six rats per group. Body weight groups were compared using *T*-tests and Dunnett's multiple-comparisons test with GraphPad Software version 6.0 (San Diego, CA, USA). MFs (RET^{CD59-} and RBC^{CD59-} frequencies) are expressed per 10⁶ RETs or total RBCs, and the data were log₁₀ transformed. The incidence of RETs is expressed as the frequency percentage. All groups were compared using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Sidak's multiple-comparisons test; a *p* value of <0.05 was chosen to indicate statistically significant differences between groups.

3. Results

The UN animals classified as moderately malnourished weighed significantly less than the animals in the WN group (Table 1). This finding can be explained by reduced nutrient availability for pup's growth and development during the lactation and post-weaning periods in the groups on a restricted food diet.

When animals were exposed to ENU, we observed a decrease in body weight relative to the vehicle control groups. For instance, compared with the UN vehicle group, the body weight of UN rats treated with 20 mg/kg/day ENU was significantly lower on days 49–63, whereas the body weight of UN rats treated with 40 mg/kg/day ENU was significantly lower on days 28–63 (Table 1).

Pig-a MFs were monitored over a period of 63 days (9 weeks) in RETs (Fig. 2) and RBCs (Fig. 3) from UN and WN Han-Wistar rats and are presented as the mean and standard error. The figures provide data for three treatment categories: vehicle and 20 or 40 mg/kg ENU for three consecutive days. In the vehicle-treated control rats, the RET^{CD59-} and RBC^{CD59-} frequencies were consistently higher in the UN group than the WN group. Over the study period, the mean RET^{CD59-} frequency in the vehicle-treated control animals remained at 1.4×10^{-6} in the WN group but ranged from 13.5 to 18.8×10^{-6} in the UN group (Fig. 2, left panel). The mean RBC^{CD59-} frequencies in the vehicle-treated control group ranged from 0.7 to 1.6×10^{-6} in the WN group and from 14.7 to 14.9×10^{-6} in the UN group (Fig. 3, left panel). Both the RET^{CD59-} and RBC^{CD59-} frequencies were significantly higher in the UN than the WN group of vehicle control rats at all sampling times.

A dose- and time-dependent increase in the RET^{CD59-} frequency was observed from Day 7 to Day 63 in ENU-exposed WN and UN rats (Fig. 2, middle and right panels). ENU treatment increased the *Pig-a* MF in RETs in the WN rats and UN rats, but the difference was not statistically significant. The recorded RBC^{CD59-} frequencies are shown in Fig. 3. An increase similar to that observed for the RET^{CD59-} frequencies was found in RBCs from Day 7 to Day 63 in WN rats exposed to ENU. An unexpected decrease in the RBC^{CD59-} frequency was detected after Day 42 in the UN group treated with 40 mg/kg/day ENU compared with the WN group treated with the same ENU dose (Fig. 3, right panel). RET frequencies tended to decrease in UN rats exposed to ENU, but this decrease was not statistically significant (Fig. 4).

In summary, the RET^{CD59-} and RBC^{CD59-} frequencies recorded in the vehicle-treated control rats from the WN and UN groups were stable from the beginning to the end of the evaluation period. A robust increase in *Pig-a* MFs was observed in the ENU-treated WN and UN rats, and these increased MFs persisted for approximately 9 weeks after the three days of exposure. MFs were higher in RETs compared with RBCs.

4. Discussion

Previous studies have shown that dietary (caloric) restriction during *in utero* development is sufficient to decrease the frequency of induced mutants in the *lacZ* and *cII* transgenes of MutaMouse compared with animals fed *ad libitum* [22]. In addition, CD Sprague-Dawley rats fed a calorie-restricted diet postnatally exhibit reduced *HPRT* MFs compared with animals fed *ad libitum* [26]. However, this type of food restriction restricts only calories, not micronutrients. In malnutrition, there is an imbalance in nutrient intake, including the intake of carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, and minerals; in previous studies, this nutrient insufficiency has been shown to result in increases in DNA damage [3].

In experimental models, nutrient deficiencies of the type observed under malnutrition have been shown to affect cellular genetic integrity. Cells from malnourished rats exhibit low levels of RNA polymerase, a reduced protein content, cell cycle changes, alterations in the structural integrity of bone marrow chromosomes and extended generation times in bone marrow [27–29].

We evaluated the effect of moderate malnutrition on spontaneous and induced MFs using the *in vivo Pig-a* assay in RETs and RBCs isolated from the peripheral blood of rats from lactation to young adulthood to determine whether the negative imbalance of nutrients has an effect on MFs. The results indicated that the aver-

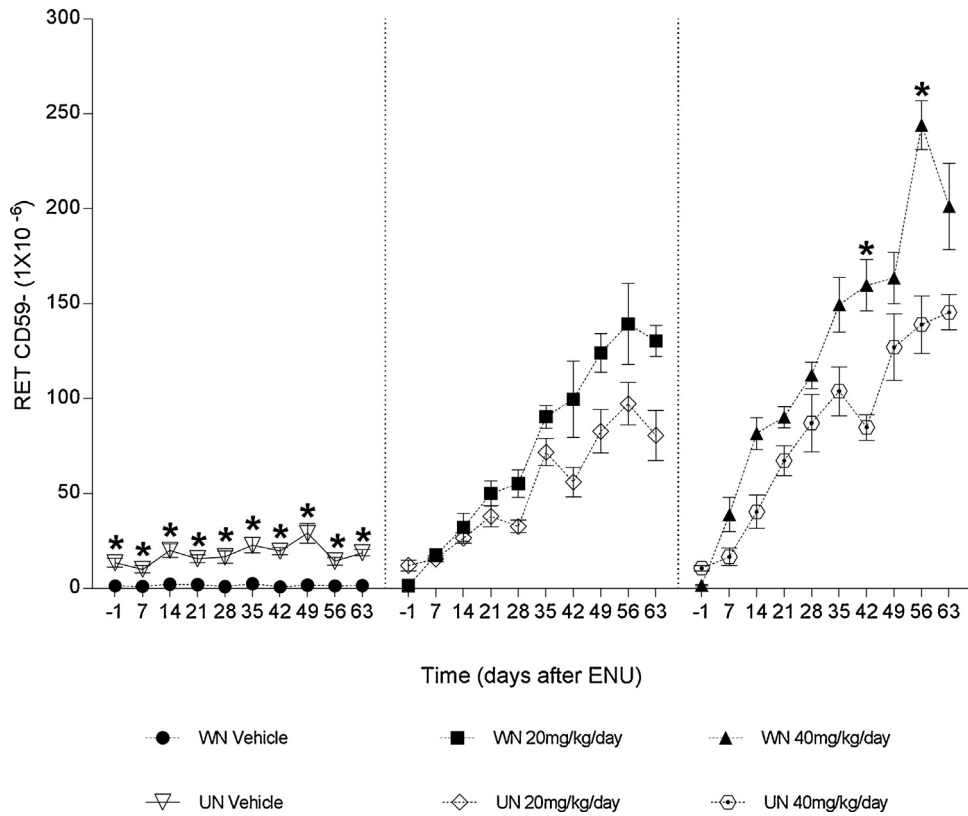


Fig. 2. Frequency of CD59-deficient RETs in UN and WN rats exposed to ENU. The mean and standard error of the MF in vehicle-treated rats was significantly higher in UN rats than in WN rats at all sampling times. ENU induced a higher RET *Pig-a* MF in WN rats than in UN rats, but the difference was not significant. *Significant differences in the UN versus WN groups, $P < 0.05$, $n = 6$.

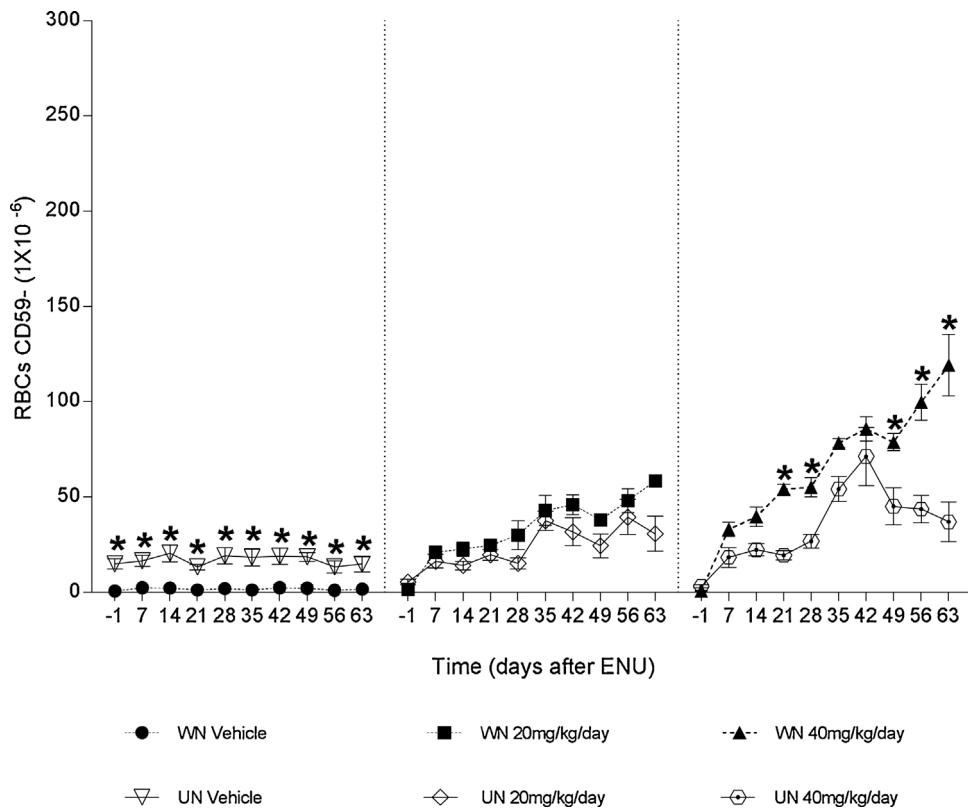


Fig. 3. Frequency of CD59-deficient RBCs in UN and WN rats exposed to ENU. The mean and standard error of the MF in vehicle-treated rats was significantly higher in UN rats than in WN rats at all sampling times. ENU induced a higher RBC *Pig-a* MF in WN rats than in UN rats, but the difference was not significant. *Significant difference in the UN versus WN groups, $P < 0.05$, $n = 6$.

Table 1
Body weight of well-nourished (WN) and undernourished (UN) rats exposed and not exposed to ENU.

Age (day)	WN Vehicle Weight (g) X ± SD	WN 20 mg/kg/day Weight (g) X ± SD	WN 40 mg/kg/day Weight (g) X ± SD
-1	35.1 ± 2.1	35.9 ± 3.9	34.5 ± 3.9
7	52.9 ± 1.1	52.0 ± 5.3	48.1 ± 4.6
14	73.0 ± 6.3	75.7 ± 4.8	67.6 ± 5.3
21	119.1 ± 7.4	98.2 ± 16.2	95.1 ± 10.3a
28	174.1 ± 6.8	147.8 ± 6.9a	135.2 ± 22.8a
35	206.4 ± 22.2	177.3 ± 12.9a	172.8 ± 22.4a
42	240.5 ± 11.8	186.7 ± 23.7a	191.0 ± 37.1a
49	286.5 ± 35.7	263.2 ± 28.4	244.1 ± 32.3a
56	313.0 ± 30.0	302.7 ± 9.4	276.1 ± 25.5a
63	365.9 ± 38.6	329.7 ± 8.4a	298.8 ± 23.2a

Age (day)	UN Vehicle Weight (g) X ± SD	UN 20 mg/kg/day Weight (g) X ± SD	UN 40 mg/kg/day Weight (g) X ± SD
-1	23.7 ± 1.2*	26.5 ± 2.0*	25.2 ± 1.8*
7	34.5 ± 2.5*	39.5 ± 4.7*	34.0 ± 2.6*
14	49.2 ± 3.2*	38.6 ± 7.6*	47.5 ± 3.4*
21	61.5 ± 14.9*	70.9 ± 13.3*	60.4 ± 8.4*
28	99.0 ± 18.4*	97.3 ± 4.3*	65.0 ± 3.6*b
35	129.4 ± 8.0*	114.9 ± 12.3*	81.5 ± 16.1*b
42	158.0 ± 18.6*	149.9 ± 22.2*	99.1 ± 25.7*b
49	207.8 ± 32.1*	170.3 ± 27.1*b	112.8 ± 27.2*b
56	221.9 ± 38.7*	193.8 ± 24.6*b	128.4 ± 28.4*b
63	252.9 ± 37.9*	205.0 ± 36.0*b	174.8 ± 38.4*b

Values are presented as the mean ± standard deviation (SD). * Significant differences in the UN versus WN groups, with and without ENU, $P < 0.05$, $n = 6$; a significant differences between the WN 20 and 40 mg/kg/day groups versus the WN vehicle group, $P < 0.05$, $n = 6$; b significant differences in the UN 20 and 40 mg/kg/day groups versus the UN vehicle group, $P < 0.05$, $n = 6$.

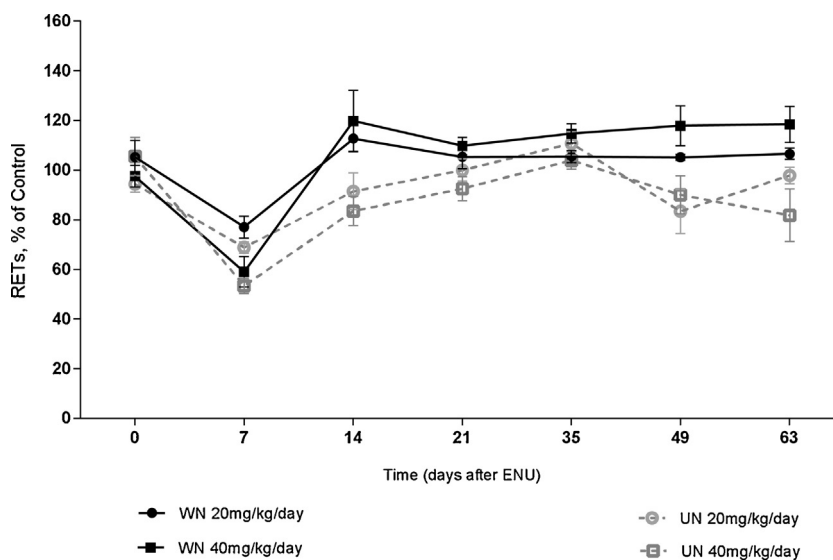


Fig. 4. % RETs in UN and WN rats exposed to ENU. Means and standard errors. The differences between groups were not statistically significant $n = 6$.

age frequency of spontaneous RET^{CD59-} in peripheral blood was 9.6 times greater in the UN rats than the WN rats ($13.5 \pm 5.5 \times 10^{-6}$ in the UN group vs. $1.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ in the WN group) on Day-1 and 13.5 times greater in the UN rats on Day 79. The frequency of spontaneous mutants induced by malnutrition is similar to the frequency induced by the administration of weak gene mutagens, such as treatment with 5 mg/kg/day chlorambucil for 29 days or 37.5 mg/kg/day 1,3-propane sultone for 16 days [30]. In this study, we observed that the frequency of spontaneous mutants in the RETs of WN rats was consistent with those reported previously [31,32]. The ENU-exposed animals in the two nutrition groups exhibited significant time- and dose-dependent increases in RET^{CD59-} and RBC^{CD59-} frequencies.

Moderate malnutrition during early development and growth apparently affected the spontaneous *Pig-a* MF. The data show that

moderate malnutrition increased the spontaneous MF, which may be related to a mutagenic effect in the absence of nutrients, as micronutrients such as vitamins and minerals have been suggested to play a role in various DNA maintenance reactions and in the prevention of genomic instability [33]. This effect was consistent across all study days. However, a reduction of the induced MF was observed in UN rats compared with WN rats after exposure to ENU.

In the groups exposed to 20 mg/kg ENU, we observed increases in the RET^{CD59-} frequencies that were similar to the frequency reported by Phonethepswath et al. [25]. In the groups exposed to 40 mg/kg ENU, the RET^{CD59-} frequencies were lower than that reported by Phonethepswath et al. [25]. In both cases, we observed similar mutant induction in the WN and UN groups. This result regarding the increase in MN frequencies that we observed in trimethoprim-sulfamethoxazole and mitomycin C-treated UN rats

was surprising [10,16]. However, the ENU-induced MFs in the UN group were lower than in the WN group, and it is possible that high-throughput versions of the *Pig-a* assay involving magnetic enrichment [18] may have shown that the lower MFs in the UN group were significant.

According to the results reported by Ortiz et al. [10] the RET percentage is lower in rats with severe malnutrition than in controls. Borelli et al. [34,35] found that in mice subjected to malnutrition, hematopoiesis results in changes in the percentages of erythroid progenitors and long cell differentiation times. This could indicate that severe malnutrition is associated with bone marrow suppression, reducing RET production. In this study, although a reduction of RETs was observed, moderate malnutrition had no statistically significant effect on the percentage of RETs.

Further studies will be necessary to address the relationship between the levels of specific micronutrients that may be required for genome stability, DNA repair, and susceptibility to mutations in the *Pig-a* gene. There is an association between malnutrition and changes in the bone marrow (BM) microenvironment leading to impaired hematopoiesis in mice, which also affects the activity of stem and progenitor cells [7] and is the source of mutants in the *Pig-a* assay. It has been reported that malnutrition produces diverse cytogenetic effects in the BM [7,36–38]. Changes in the structure of BM compromise cell interactions and cell cycle entry signals, affecting the proliferation of hematopoietic progenitor cells [7]. The increase in the *Pig-a* MF in the UN vehicle group suggests that this group experienced higher levels ($18.8 \pm 4.1 \times 10^{-6}$) of genetic insult compared with the WN vehicle group ($1.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$), starting early in the monitoring period and continuing until the end of monitoring. As noted above, we also expected to observe a higher MF in the UN group of animals compared with the WN group following exposure to an equal dose of ENU. The slightly (albeit, not significantly) lower MFs recorded in the ENU-treated UN groups may have occurred because the animals were exposed to a strong mutagen, causing severe damage to the BM. The perturbations in BM caused by malnutrition also may have had the effect of increasing the time required to repair ENU-induced DNA adducts in the UN rats, thus reducing MFs.

Understanding the differences between the effects of malnutrition on spontaneous and induced gene mutations will require follow-up studies that examine the mechanisms responsible for the two responses. ENU is known to induce gene mutations mainly through the induction of base-pair substitutions [39,40], differing considerably from the type of genetic damage measured as clastogenicity/aneugenicity and DNA strand breaks, which has been shown to increase in UN rats. Perhaps the types of damage being measured in the control animals not exposed to ENU are more similar to the types being measured in the MN and comet assays, thus explaining the increase observed in UN rats. Inducing *Pig-a* mutations with a more potent clastogen, such as cyclophosphamide or X-rays, might be a way of testing this hypothesis. In addition, sequencing the mutants present in UN and WN rats would provide valuable information with respect to the underlying mechanisms. However, while the RET/RBC *Pig-a* assay has many attractive features, one of its limitations is the difficulty of characterizing the types of mutations responsible for the *Pig-a* mutant phenotype. Both *Pig-a* and *Hprt* mutants can be readily measured in rat lymphocytes, which lend themselves to molecular analysis of mutations [41]. These assays would provide a means of confirming and understanding the responses observed in the present study.

5. Conclusions

Malnourishment increases the frequency of spontaneous *Pig-a* mutations. ENU increased the *Pig-a* MF in both RETs and RBCs in

the WN groups compared with the UN groups, but these differences were not statistically significant. To understand this dichotomy in response, further studies should use other mutagens and nucleated surrogate cells and should examine the types of mutations induced in UN and WN rats.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work was supported in part by the National Council of Science and Technology, CONACYT, México, through a scholarship for postgraduate studies (248814) to M. Monserrat Pacheco-Martínez.

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs. Robert H. Heflich and Javed A. Bhalli for their special comments and suggestions about this study. Additionally, the authors would like to express their gratitude to Drs. Miguel Betancourt and Rafael Valencia for all of their observations about the manuscript.

References

- [1] F. Gómez, Desnutrición, *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 4 (2003) S576–S582.
- [2] K. Corware, V. Yardley, C. Mack, S. Schuster, H. Al-Hassi, et al., Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages, *Nutr. Metab.* 11 (2014) 51–61, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-11-51>.
- [3] L. Rodríguez, E. Cervantes, R. Ortiz, Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: a public health Problem, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8 (2011) 1174–1205, <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph8041174>.
- [4] Z.A. Bhutta, R.A. Salam, Global nutrition epidemiology and trends, *Ann. Nutr. Metab.* 61 (2012) 19–27, <http://dx.doi.org/10.1159/000345167>.
- [5] L. Abramsson-Zetterberg, G. Zetterberg, M. Bergqvist, J. Grawe, Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 36 (2000) 22–31.
- [6] G. Krishna, M. Hayashi, In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, *Mutat. Res.* 455 (2000) 155–166.
- [7] K. Nakajima, A.R. Crisma, G.B. Silva, M.M. Rogero, R.A. Fock, et al., Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation, *Nutrition* 30 (2014) 82–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013>.
- [8] P.B. Murthy, P. Bhaskaram, S.G. Srikantia, Sister chromatid exchanges in protein-energy malnutrition, *Hum. Genet.* 55 (1980) 405–406.
- [9] E. Cervantes-Rios, R. Ortiz-Muniz, A.L. Martínez-Hernández, L. Cabrera-Rojo, J. Graniel-Guerrero, et al., Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children, *Mutat. Res.* 731 (2012) 68–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.11.006>.
- [10] R. Ortiz, H. Medina, E. Cortes, E. Cervantes, L. Rodríguez, Trimethoprim-sulfamethoxazole increase micronuclei formation in peripheral blood from weanling well-nourished and malnourished rats, *Environ. Mol. Mutagen.* 52 (2011) 673–680, <http://dx.doi.org/10.1002/em.20670>.
- [11] E. Cortes, C. Gonzalez, M. Betancourt, R. Ortiz, Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 21 (2001) 231–247.
- [12] R. Ortiz, C. Campos, J.L. Gomez, M. Espinoza, M. Ramos-Motilla, et al., Sister-chromatid exchange (SCE) and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition (PCM), *Mutat. Res.* 312 (1994) 33–37.
- [13] R. Ortiz, E. Cortes, C. Gonzalez, L. Perez, M. Betancourt, Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 55–59.
- [14] R. Ortiz, L. Cortes, C. Gonzalez, L. Lopez, P. Perez, et al., Analysis of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 363–370.
- [15] M. Celik, K. Sermatov, M. Abuhandan, D. Zeyrek, A. Kocyigit, et al., Oxidative status and DNA damage in children with marasmic malnutrition, *J. Clin. Lab. Anal.* 26 (2012) 161–166, <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.21505>.
- [16] R. Ortiz, H. Medina, L. Rodríguez, H. Gonzalez-Marquez, E. Cortes, Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats, *Environ. Mol. Mutagen.* 43 (2004) 179–185.
- [17] J.A. Bhalli, J.G. Shaddock, M.G. Pearce, V.N. Dobrovolsky, Sensitivity of the *Pig-a* assay for detecting gene mutation in rats exposed acutely to strong

- clastogens, *Mutagenesis* 28 (2013) 447–455, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/get022>.
- [18] S.D. Dertinger, S.M. Bryce, S. Phonetheswath, S.L. Avlasevich, When pigs fly: immunomagnetic separation facilitates rapid determination of Pig-a mutant frequency by flow cytometric analysis, *Mutat. Res.* 721 (2011) 163–170, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.01.009>.
- [19] S.D. Dertinger, S. Phonetheswath, P. Weller, J. Nicolette, J. Murray, et al., International Pig-a gene mutation assay trial: evaluation of transferability across 14 laboratories, *Environ. Mol. Mutagen.* 52 (2011) 690–698, <http://dx.doi.org/10.1002/em.20672>.
- [20] V.N. Dobrovolsky, X. Cao, J.A. Bhalli, R.H. Heflich, Detection of Pig-a mutant erythrocytes in the peripheral blood of rats and mice, *Methods Mol. Biol.* 1105 (2014) 205–221, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-739-6_17.
- [21] T. Kinoshita, M. Fujita, Y. Maeda, Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI- anchored proteins: recent progress, *J. Biochem.* 144 (2008) 287–294, <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvn090>.
- [22] N. Shima, R.R. Swiger, J.A. Heddle, Dietary restriction during murine development provides protection against MNU-induced mutations, *Mutat. Res.* 470 (2000) 189–200.
- [23] R. Ortiz, C. González, P. Pérez, M. Betancourt, Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation, *Med. Sci. Res.* 24 (1996) 843–846.
- [24] M. Cossio-Bolaños, R. Gomez Campos, R. Vargas Vitoria, R.T. Hochmuller Fogaca, M. de Arruda, Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats, *Nutr. Hosp.* 28 (2013) 2151–2156, <http://dx.doi.org/10.3305/nutr Hosp.v28in06.6659>.
- [25] S. Phonetheswath, D. Franklin, D.K. Torous, S.M. Bryce, J.C. Bemis, et al., Pig-a mutation: kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens, *Toxicol. Sci.* 114 (2010) 59–70, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfp289>.
- [26] A. Aidoo, R.A. Mittelstaedt, M.E. Bishop, L.E. Lyn-Cook, Y.J. Chen, et al., Effect of caloric restriction on Hprt lymphocyte mutation in aging rats, *Mutat. Res.* 527 (2003) 57–66.
- [27] F. Garrido, P. Oliva, M. Perretta, Activity of RNA polymerase in isolated nuclei of liver, spleen and bone marrow of rats with experimental protein and protein-calorie malnutrition, *Rev. Chil. Nutr.* 9 (1981) 7–26.
- [28] J.L. Gómez, C. Campos, P. Rangel, R. Ortiz, Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling, *Mutat. Res.* 352 (1996) 57–60.
- [29] V. Alu, P.B. Murthy, Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats and in utero upon rehabilitation, *Experientia* 49 (1993) 258–262.
- [30] S.D. Dertinger, S. Phonetheswath, S.L. Avlasevich, D.K. Torous, J. Mereness, et al., Pig-a gene mutation and micronucleated reticulocyte induction in rats exposed to tumorigenic doses of the leukemogenic agents chlorambucil, thiotepe, melphalan, and 1,3-propane sultone, *Environ. Mol. Mutagen.* 55 (2014) 299–308, <http://dx.doi.org/10.1002/em.21846>.
- [31] D. Miura, V.N. Dobrovolsky, Y. Kasahara, Y. Katsuura, R.H. Heflich, 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 (2008) 614–621, <http://dx.doi.org/10.1002/em.20414>.
- [32] S. Phonetheswath, S.M. Bryce, J.C. Bemis, S.D. Dertinger, Erythrocyte-based Pig-a gene mutation assay: demonstration of cross-species potential, *Mutat. Res.* 657 (2008) 122–126, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.08.011>.
- [33] M. Fenech, Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs), *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1113–1117.
- [34] P. Borelli, F.E. Barros, K. Nakajima, S. Blatt, B. Beutler, J. Pereira, et al., Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage: thereby altering cell production rates, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42 (2009) 523–530.
- [35] P. Borelli, S. Blatt, J. Pereira, B.B. de Maurino, M. Tsujita, A.C. de Souza, et al., Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition, *Br. J. Nutr.* 97 (2007) 307–314.
- [36] P. Veena, P.B. Murthy, Sister-chromatid exchange frequency is elevated and cell proliferation is delayed in bone marrow cells of starved and marginally malnourished rats, *Mutat. Res.* 341 (1994) 101–108.
- [37] M. Betancourt, R. Ortiz, C. Gonzalez, Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation, *Mutat. Res.* 283 (1992) 173–177.
- [38] S. Olmos, M.F. Reinoso, M.G. Marquez, M.E. Roux, Cytogenetic studies in bone marrow cells from Wistar rats in protein malnutrition, *Metabolism* 50 (2001) 1025–1029, <http://dx.doi.org/10.1053/meta.2001.25657>.
- [39] J. Revollo, M.G. Pearce, D.M. Petibone, R.A. Mittelstaedt, V.N. Dobrovolsky, Confirmation of Pig-a mutation in flow cytometry-identified CD48-deficient T-lymphocytes from F344 rats, *Mutagenesis* 30 (2015) 315–324, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geu030>.
- [40] B.B. Gollapudi, A.M. Lynch, R.H. Heflich, S.D. Dertinger, V.N. Dobrovolsky, et al., The in vivo Pig-a assay: a report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup, *Mutat. Res.* 783 (2015) 23–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.09.007>.
- [41] V.N. Dobrovolsky, J.G. Shaddock, R.A. Mittelstaedt, D. Miura, R.H. Heflich, Detection of in vivo mutation in the Hprt and Pig-a genes of rat lymphocytes, *Methods Mol. Biol.* 1044 (2013) 79–95, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_4.

EL GEN *PIG-A* COMO INDICADOR DE MUTACIONES SOMÁTICAS *In vivo*

Mercedes Monserrat PACHECO MARTÍNEZ¹, Elsa CERVANTES RÍOS²,
María Del Carmen GARCÍA RODRÍGUEZ³ y Alda Rocío ORTIZ MUÑOZ^{2*}

¹ Programa de Posgrado en Biología Experimental, Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340 Ciudad de México, D.F.

² Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340 Ciudad de México, D.F.

³ Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis. Unidad de Investigación en Genética (UNIGEN). Laboratorio 2 planta alta UMIEZ, campus 2. Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza". Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Guelatao 66, Ejército de Oriente, 09230 Ciudad de México, D.F.

*Autor de correspondencia: arom@xanum.uam.mx

(Recibido noviembre 2013; aceptado septiembre 2014)

Palabras clave: Gen *PIG-A/Pig-a*, mutagénesis, reticulocitos, eritrocitos, citometría de flujo

RESUMEN

La medición cuantitativa de las mutaciones es fundamental en el campo de la mutagénesis ambiental. Recientemente se han descrito nuevos métodos para su valoración y para la evaluación de mutaciones inducidas por agentes químicos *in vivo*. Uno de ellos está basado en el análisis del fenotipo relacionado con la expresión del gen fosfatidilinositol glicano de clase A (*PIG-A* en humanos y *Pig-a* en roedores). Este gen está ligado al cromosoma X y es esencial para la síntesis del ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI) que une proteínas específicas a la superficie de la célula. Cuando ocurre una mutación en *PIG-A*, la síntesis de GPI se bloquea, esto provoca que las proteínas no se encuentren en la membrana celular dando origen al fenotipo GPI negativo, el cual es de fácil detección por medio de citometría de flujo. En el presente trabajo se describe y se realiza un análisis del ensayo *PIG-A*: su desarrollo, ventajas y desventajas así como su validación. Asimismo, se refieren las características que permiten proponer al *PIG-A* como centinela en estudios de mutagénesis y las perspectivas de estos estudios. Este método presenta gran potencial para el estudio *in vivo* de las tasas de mutaciones somáticas y su cinética de inducción por exposición a mutagénos. El ensayo tiene la ventaja de ser práctico, mínimamente invasivo, relativamente económico y reproducible. Por lo que resulta ser una herramienta adecuada para uso rutinario que puede integrarse a otros análisis citogenéticos para detectar alteraciones cromosómicas y génicas. Además puede ser útil en estudios de genotoxicología ambiental y en la evaluación genotóxica de compuestos químicos.

Key words: *PIG-A/Pig-a* gene, mutagenesis, reticulocytes, erythrocytes, flow cytometry.

ABSTRACT

The quantitative measuring of somatic mutations is critical for the understanding of environmental mutagenesis. New methods for its appraisal, as well as for the evaluation of mutations induced by chemical agents *in vivo*, have been recently described. One of them is based upon the analysis of the phenotype related to the expression of the phosphatidylinositol glycan class A gene (*PIG-A* in humans and *Pig-a* in rodents). This is an X-linked gene essential for the synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI) that attaches specific proteins to the cell surface. When a *PIG-A* mutation takes place, GPI synthesis is blocked; hence, proteins are not found on the cell membrane generating a negative GPI phenotype, which can be easily detected by flow cytometry. This paper describes and analyses a *PIG-A* assay: its development, advantages and disadvantages as well as its validation. Likewise, this paper refers to the characteristics that allow us to propose *PIG-A* as a sentinel in mutagenesis studies and the perspectives of such studies. This method offers great potential for the *in vivo* study of somatic mutation rates and their induction kinetics due to mutagen exposure. This assay poses several advantages: it is practical, minimally invasive, cost-effective and reproducible. Moreover, it can prove to be useful to study environmental genotoxicity and to evaluate chemical compound genotoxicity.

INTRODUCCIÓN

Los estudios en el área de la toxicología genética han generado numerosos procedimientos *in vivo* e *in vitro*, para monitorear los efectos que diversos agentes físicos y químicos tienen sobre la integridad genética, así como los posibles riesgos que estos elementos representan para los organismos (Abramsson *et al.* 2000, Krishna y Hayashi 2000). Entre los procedimientos se incluyen: la medición de proteínas asociadas al ácido desoxirribonucleico (ADN), la localización de mutaciones puntuales (eventos genéticos que afectan un gen específico), el estudio de intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y micronúcleos (MN), entre otros (Abramsson *et al.* 2000).

Recientemente, se ha propuesto como prueba rutinaria para evaluar el potencial mutagénico de agentes químicos la detección de mutaciones somáticas usando como gen centinela el “fosfatidilinositol glicano de clase A” (*PIG-A* en humanos y *Pig-a* en roedores). También se sugiere que puede ser útil para el estudio de poblaciones humanas expuestas a contaminantes ambientales y en animales de experimentación así como para determinar el riesgo de desarrollar cáncer (Hernández *et al.* 2008, Peruzzi *et al.* 2010, Dobrovolsky *et al.* 2010, Dertinger *et al.* 2011b).

Existen pruebas basadas en la detección de mutaciones en otros genes como el de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT), que detecta células resistentes a la 6-tioguanina (mutantes). Este método presenta restricciones para el análisis de mutagénesis *in vivo*, ya que requiere de laboriosos

procedimientos para su detección y tiene una sensibilidad limitada (Cortés 1993).

Por otra parte, el uso de animales transgénicos como el ratón “BigBlue” y el “MutaMouse” ha sido aplicado y aceptado como un modelo para el estudio de mutaciones *in vivo*. Sin embargo, debido a su alto costo y a que no son transferibles para la detección en humanos, su uso es limitado (DH Toxicology Unit/Secretariat 2010)

Dentro de los estudios de genotoxicidad *in vivo* de uso rutinario, la alternativa más reportada ha sido el análisis de la síntesis de ADN no programada (UDS), aunque presenta baja sensibilidad (Kirkland y Speit 2008). La electroforesis unicelular (ensayo cometa) también ha sido considerada, sin embargo, este método sirve para evaluar daño primario en el ADN, el cual no proporciona información consistente con la inducción de mutaciones, ya que no todos los tipos de daño en el ADN son igualmente mutagénicos (Heflich *et al.* 1982, Pottenger *et al.* 2007, Blakey *et al.* 2008).

Es importante medir la mutación de genes *in vivo* con la finalidad de evaluar la seguridad genotóxica con una mayor confiabilidad. *PIG-A* ha sido identificado como un gen con un alto potencial para el estudio *in vivo* de las tasas de mutaciones somáticas y su cinética de inducción por agentes químicos (Dobrovolsky *et al.* 2010).

GEN *PIG-A*

El nombre y símbolo oficial de este gen es: “fosfatidilinositol glicano de clase A” (*PIG-A*), pertenece

a una familia de genes llamados *PIG*, se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Takahaski *et al.* 1993, Rosee 1997, Tomita 1999, Phonethepswath *et al.* 2008). Codifica para la subunidad catalítica de la enzima 1-6-N-acetilglucosaminiltransferasa que participa en la primera etapa de la biosíntesis de la molécula de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). En la síntesis de esta ancla participan alrededor de 20 genes diferentes (Kinoshita *et al.* 1997, Ferguson 1999), de los cuales *PIG-A* es el único que se encuentra en el cromosoma X.

Se ha demostrado que la enfermedad conocida como hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es resultado de mutaciones en *PIG-A*, las cuales se presentan en las células troncales hematopoyéticas, produciendo células sanguíneas anormales. Se han identificado más de un centenar de mutaciones somáticas en *PIG-A*. El gen contiene 6 exones y 5 intrones, el exón 2 es el más grande y en él ocurren la mayoría de las mutaciones, las cuales en general consisten en la inserción de una señal de parada prematura en las instrucciones para sintetizar el GPI, originando una proteína anormalmente pequeña y no funcional (Brodsky 2008, Genetics Home Reference 2013).

BIOSÍNTESIS DE GPI

GPI es un glicolípido que une diversas proteínas a la membrana de la célula, asegurando que las mismas se localicen en la superficie celular cuando sean necesarias (Takahaski *et al.* 1993, Hernández-Campo *et al.* 2008). Su función principal es permitir una asociación estable entre las proteínas y la membrana celular (Phonethepswath *et al.* 2008). Tiene una estructura altamente conservada a lo largo de la evolución. Consta de una molécula de fosfatidilinositol, un núcleo glicano formado por N-glucosamina, 3 manosas, y una molécula de fosfoetanolamina (**Fig. 1**) (Hernández-Campo *et al.* 2008).

Su biosíntesis inicia en la cara externa del retículo endoplásmico y se completa en la cara interna del aparato de Golgi (Stevens y Raetz 1991). El primer paso consiste en la formación del núcleo glicano y está catalizado por una transferasa, la cual se encarga de añadir una molécula de N-acetilglucosamina (proveniente del uridindifosfato N-acetilglucosamina: UDP-N acetil glucosamina) a la molécula de fosfatidilinositol. Cuando existe una mutación en *PIG-A* la enzima 1-6-N-acetil-glucosaminil transferasa no se sintetiza adecuadamente y la producción de GPI se bloquea (Takahashi *et al.* 1993).

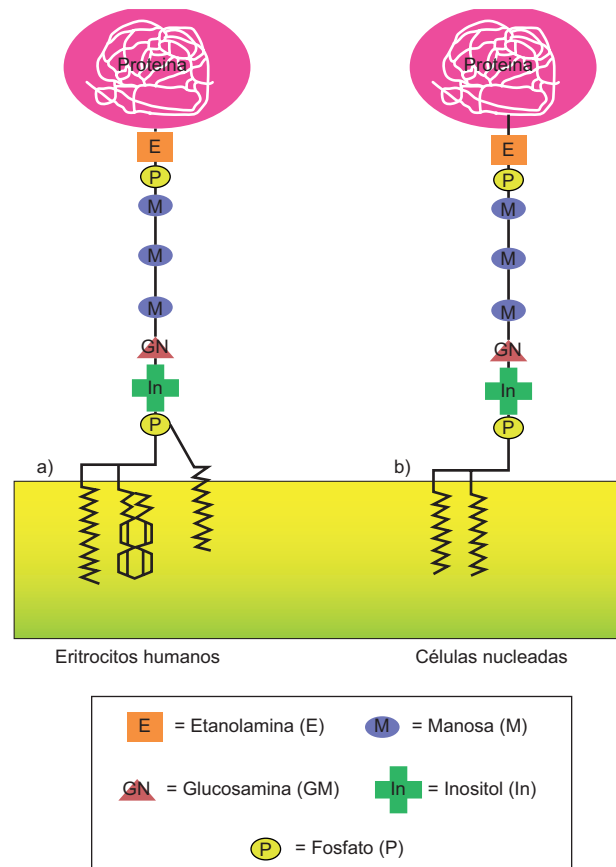


Fig. 1. Estructura de la molécula GPI, modificado de Kinoshita 2008.

La estructura básica del GPI consiste de: fosfatidil inositol (In) unido a tres (a) o a dos colas de ácidos grasos (b) insertados en la membrana citoplásmica, una molécula de glucosamina (GN), tres manosas (M) y un puente de etanolamina fosforilada (E), la cual sirve de unión para la proteína anclada. En la figura se ilustra la diferencia en la composición de las colas lipídicas unidas al fosfatidilinositol en células nucleadas y eritrocitos de mamíferos: Las tres cadenas lipídicas debajo del fosfatidilinositol en eritrocitos pueden hacer más estable su asociación con la membrana. La unión a la membrana celular se realiza a través de la molécula de fosfatidilinositol, que se inserta en la bicapa lipídica mediante los ácidos grasos situados en los carbonos 1 y 2 del glicerol. El primero de ellos se une a través de un enlace éter, mientras que el segundo suele ser un ácido graso altamente insaturado, como el ácido araquidónico, que se une como radical acilo (McConville *et al.* 1993). En los mamíferos hay un tercer ácido graso, generalmente ácido palmítico, que se une al inositol (Walter *et al.* 1990).

Una vez sintetizada la molécula de GPI en el retículo endoplásmico, ésta se une a las proteínas nacientes por medio de una reacción mediada por una transamidasa, durante la cual el extremo carboxilo terminal de la proteína que va a ser anclada a la membrana, reacciona con el grupo amino de la fosfoetanolamina (de Macedo *et al.* 2003).

Estas proteínas unidas al GPI transitan por el aparato de Golgi para llegar a su destino final en la membrana plasmática. En estudios con linfocitos y granulocitos provenientes de pacientes con HPN, se demostró que el primer paso de la vía de síntesis del GPI estaba afectado. Por medio de análisis bioquímicos y citogenéticos, se determinó que en este paso estaban involucrados tres genes: *PIG-A*, *PIG-C* y *PIG-H*, más tarde se demostró que las mutaciones en *PIG-A* son las responsables de las anomalías descritas en la HPN (Yamada *et al.* 1995).

PROTEÍNAS ANCLADAS A GPI

Las proteínas ancladas a través del GPI a la membrana citoplasmática tienen un papel importante en diferentes funciones celulares (McConville *et al.* 1993). El hecho de que el núcleo estructural de esta molécula se haya conservado a lo largo de la evolución, evidencia su importancia biológica. GPI se distribuye ampliamente entre los organismos eucariotas, incluyendo protozoarios, hongos, plantas, insectos y mamíferos (Nosjean *et al.* 1997).

Las proteínas ancladas por medio del GPI no tienen una distribución uniforme en la membrana citoplasmática, sino que se sitúan en microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol, denominados balsas lipídicas o “rafts” (Harder y Simons 1997), el ancla GPI confiere a las proteínas una elevada

movilidad lateral sobre la superficie celular. Éstas pueden inducir señales intracelulares en las que intervienen segundos mensajeros (Orlean, 1990), los cuales pueden promover la activación e incluso la proliferación de células hematopoyéticas (Robinson, 1991).

En términos generales hoy se sabe que las balsas lipídicas están implicadas en procesos de señalización celular (Bromley *et al.* 2001, Head *et al.* 2014), circulación de proteínas intracelulares (Brown y Rose 1992) y endocitosis independiente de clatrina (Danielsen y van Deurs 1995, Pike 2006). Hasta la fecha se han identificado numerosas proteínas que se unen a la membrana celular por medio del GPI (**Cuadro I**). Entre ellas está CD59 que es una glucoproteína de membrana que pesa de 18-20 kDa. Además de participar en las vías de señalización en linfocitos, se ha reportado que su función consiste en proteger a las células sanguíneas y vasculares contra la lisis mediada por proteínas séricas del complemento; inhibiendo la formación de poros en la membrana, lo cual evita la lisis celular (Sugita *et al.* 1989).

Pig-a / *PIG-A*: GEN CENTINELA EN MUTAGÉNESIS

Para que un gen sea considerado centinela, debe cumplir con las siguientes características que permiten medir la tasa de mutación:

CUADRO I. FUNCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE ALGUNAS DE LAS PROTEÍNAS ANCLADAS A GPI (MODIFICADO DE PAULICK Y BERTOZZI, 2008)

Función	Proteína	Localización
Enzimas	Fosfatasa alcalina	Tejidos de mamíferos
	5'-nucleotidasa	Tejidos de mamíferos
	Acetilcolinesterasa	Células sanguíneas mamíferos
	Dipeptidasa	Riñón y pulmón de cerdo, oveja y humano
Interacción célula-célula	LFA-3	Células sanguíneas humanas
	NCAM	Mamíferos
	PH-20	Espermatozoides de cobayo
Regulación del complemento	CD55 (DAF)	Células sanguíneas humanas
	CD59	Células sanguíneas humanas
Antígenos de mamíferos	Thy-1	Cerebro y linfocitos de mamíferos
	Qa-2	Linfocitos de ratón
	CD14	Monocitos humanos
	Antígeno carcino-embriionario (CEA)	Células tumorales humanas
	CD52	Linfocitos humanos
Antígenos de protozoarios	VSG	<i>Trypanosoma brucei</i>
	IG7	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Prociclina	<i>Trypanosoma brucei</i>

A) Las células mutantes deben ser el resultado de una mutación única o monoalélica. El *PIG-A* se encuentra en el cromosoma X, por lo tanto, sólo se requiere una mutación para la expresión del fenotipo mutante y éste no será enmascarado por la coexistencia de un alelo normal (Peruzzi *et al.* 2010).

B) Las mutantes deben ser viables, esto es, que al cultivarlas muestren un crecimiento equiparable al de las células que no tienen mutaciones (Araten *et al.* 2005). Aunque es difícil demostrar que las mutaciones en el *PIG-A* son neutrales, es decir, que no tienen ventajas o desventajas en su viabilidad y proliferación, existen evidencias de que no hay una selección negativa contra las células mutantes, y por lo tanto, en cultivo su crecimiento no se ve afectado. En este sentido, existen estudios que han demostrado que las células GPI (-) tienden a ser estables en la mayoría de los pacientes con HPN por largos periodos de tiempo, incluso años (Araten *et al.* 2002). Por otro lado, existen estudios *in vitro* (en humanos) en los que se ha observado que las colonias hematopoyéticas no exhiben selección que favorezca a las células GPI (+) (Maciejewsk *et al.* 1997). Se ha demostrado que las subpoblaciones de células GPI (+) y GPI (-) coexisten en proporciones aproximadamente iguales, sin que una subpoblación crezca más que la otra (Araten *et al.* 2005).

C) Los fenotipos mutantes deben ser fácilmente detectables (Peruzzi *et al.* 2010). Dado que el producto del *PIG-A* es una subunidad de la primera enzima necesaria para la síntesis del GPI (Kinoshita *et al.* 2008), encargado de unir proteínas a la membrana celular; las mutaciones que causan la pérdida de la actividad de la enzima se pueden detectar por la falta de esas proteínas. La ausencia de ellas ocasiona el fenotipo GPI negativo (-) el cual se puede evidenciar usando anticuerpos monoclonales; dentro de las proteínas más estudiadas se encuentran la CD24, CD59, CD55 y la CD48. El fenotipo GPI (-) se puede identificar por medio de citometría de flujo, este método permite un análisis rápido de la frecuencia de mutantes y tiene el potencial para detectar bajas tasas de mutación. Asimismo, se pueden analizar múltiples proteínas en la misma célula, minimizando así los “falsos negativos” y “falsos positivos” (Araten *et al.* 2005).

EVENTOS SIGNIFICATIVOS EN EL DESARROLLO DE LA PRUEBA *Pig-a* / *PIG-A*

A partir del año de 1999, Araten y su grupo de colaboradores se dieron a la tarea de implementar la técnica para detectar el fenotipo GPI (-) usando

citometría de flujo. Con el establecimiento de este método se desarrollaron diversos estudios que entre otras cosas, permitieron identificar mutaciones espontáneas, determinar valores de referencia para medir la frecuencia de células mutantes y la tasa de mutación. De igual forma se comenzó a evaluar el efecto mutagénico de agentes químicos como etil-N-nitrosourea (ENU) y dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) siguiendo diferentes esquemas de administración (Bryce *et al.* 2008). Un avance importante consistió en la aplicación del método en diferentes modelos celulares y animales y por otro lado se incrementó la confiabilidad del ensayo mediante el uso de anticuerpos para identificar eritrocitos. Además se logró aislar células T de animales tratados con ENU, usando la selección por aerolisina; ésta es una molécula que lisa las células GPI (+) y permite seleccionar linfocitos T GPI (-) (Dobrovolsky *et al.* 2009a).

En el **cuadro II** se muestra un resumen de los estudios realizados por diversos grupos de trabajo y se hace referencia a los eventos más importantes en el desarrollo de esta técnica.

MEDICIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MUTANTES *Pig-a* / *PIG-A*

A pesar de que este gen se expresa de forma generalizada en las células, la selección de un tipo celular para su análisis no fue sencilla. La experiencia y el éxito del ensayo con células sanguíneas de los pacientes con HPN han orientado el desarrollo de la experimentación (DH Toxicology Unit/Secretariat 2010).

Se ha logrado determinar efectivamente la tasa de la mutación en cultivos celulares y en modelos *in vivo*. En el **cuadro III** se muestran las frecuencias que han sido reportadas con diferentes protocolos. La incidencia de mutantes *Pig-a*, se puede expresar como el número de CD59 negativos (-)/ 10^{-6} en eritrocitos maduros (E) o reticulocitos (RET). Se han observado incrementos en la frecuencia de mutantes en ambos tipos celulares después de una semana de la administración del mutágeno y las respuestas máximas se presentaron aproximadamente en la semana 4. La frecuencia de mutación por lo general es mayor en RET.

Los resultados de la evaluación de diferentes agentes químicos evidenciaron que el ensayo *Pig-a* es pertinente para la identificación de mutaciones *in vivo*, y tiene claras ventajas para ser incorporado como un estudio de rutina; las muestras de sangre se pueden obtener fácilmente, de manera continua y sólo

CUADRO II. EVENTOS SIGNIFICATIVOS EN EL DESARROLLO DEL ENSAYO *Pig-a* / *PIG-A*

Modelo celular	Especie	Enfoque principal	Resultado principal	Referencia
Células sanguíneas, granulocitos	Humano	Desarrollo de la técnica para identificar células GPI (-) por citometría de flujo	Los granulocitos y células sanguíneas GPI (-) están presentes en personas sanas	Araten <i>et al.</i> 1999
Línea celular de ovario	Hámster chino	Uso del fenotipo GPI (-) para identificar mutaciones espontáneas	Las mutaciones inducidas por sustancias genotóxicas pueden ser medidas de manera rápida y sensible mediante citometría de flujo	Ross <i>et al.</i> 2005
Líneas celulares y células sanguíneas de pacientes HPN	Humano	Establecimiento del método para determinar valores normales de la frecuencia de mutantes y tasa de mutación (μ)	Se determinaron valores de referencia	Araten <i>et al.</i> 2005
Células sanguíneas	Rata	Determinación del efecto mutagénico de ENU y DMBA	Determinación de susceptibilidad génica	Bryce <i>et al.</i> 2008
Células T de bazo	Rata	Aislamiento de células T de animales tratados con ENU, usando la selección por aerolisina	Identificación de mutantes <i>PIG-a</i> en células T CD48 (-)	Miura <i>et al.</i> 2008b
Células sanguíneas	Ratón	Aplicación de la técnica en ratones	Aumento de la frecuencia de células sanguíneas CD59 (-) después de administración de ENU o DMBA	Phonethepswath <i>et al.</i> 2008
Células sanguíneas, células T	<i>Macaca mulatta</i>	Utilización de la técnica en primates	Incremento en el número de CD59 (-) y de células T resistentes a aerolisina después de administración de ENU; se encuentra correlación con los datos obtenidos por HPRT	Dobrovolsky <i>et al.</i> 2009
Células sanguíneas	Rata	Aumento de la confiabilidad del ensayo mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra eritrocitos	Se determina que el metilfenidato es un agente no mutagénico	Dobrovolsky <i>et al.</i> 2009
Células sanguíneas	Rata	Efectos de los diferentes esquemas de administración de mutágenos	Dosis pequeñas y repetitivas de ENU, tienen un efecto similar a una dosis alta de ENU	Miura <i>et al.</i> 2009

se requieren pequeñas cantidades (Bryce *et al.* 2008). Además no es invasivo y es transferible al humano, de modo que también es posible su aplicación en estudios de epidemiología. (DH Toxicology Unit/Secretariat 2010).

VALIDACIÓN DEL ENSAYO *Pig-a* / *PIG-A*

Dado que esta prueba es de reciente implementación, se han desarrollado guías, documentos y otros reportes encaminados a regular las condiciones en las cuales se deben realizar los estudios, así como a

unificar criterios para el reporte de datos, el manejo estadístico y su interpretación (Bryce *et al.* 2008, Dertinger *et al.* 2014).

Para lograr este objetivo, diversos laboratorios están involucrados en la validación del ensayo y se están enfocando en: (1) evaluar su reproducibilidad, (2) estudiar agentes mutagénicos y no mutagénicos, (3) llegar a un acuerdo para el análisis estadístico de los resultados, (4) secuenciar el ADN para establecer de manera firme la relación entre la deficiencia en la expresión del GPI y la mutación en el gen *Pig-a*, (5) evaluar que el ensayo sea reproducible con reticulocitos en diferentes especies y (6) determinar

CUADRO III. FRECUENCIAS BASALES E INDUCIDAS DE CÉLULAS MUTANTES OBTENIDAS CON DIFERENTES PROTOCOLOS DE ADMINISTRACIÓN DE MUTÁGENOS Y TINCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Mutágeno	Dosis	Modelo	Marcadores y anticuerpos	Frecuencia de mutación en testigos	Frecuencia de mutación después de la exposición a mutágeno	Referencia
ENU	120 mg/kg) vía intraperitoneal (i.p.)	Sangre periférica de ratas macho cepa F344	anti CD59 FLAER	1 a 27×10^{-6}	183×10^{-6} (semana 2) $329-413 \times 10^{-6}$ (semana 4)	Miura <i>et al.</i> 2008a
		Células T de ratas macho cepa F344	anti CD48 FLAER	$11-16 \times 10^{-6}$	$194-473 \times 10^{-6}$ (semana 4)	
ENU	100 mg/kg/día i.p	Sangre periférica de hembras cepa Sprague Dawley	anti CD59 anti CD61 Naranja de Tiazol	$18 \pm 19 \times 10^{-6}$	239 a 855×10^{-6} (semana 4-6)	Bryce <i>et al.</i> 2008
DMBA	40 mg/kg/día vía oral		anti CD59 anti CD61 Naranja de Tiazol	$18 \pm 19 \times 10^{-6}$	82 a 405×10^{-6} (semana 4-6)	
ENU	40 mg/kg, por triplicado	Sangre periférica de ratones hembra cepa CD-1	anti CD24	$14 \pm 21 \times 10^{-6}$	$500 \pm 287 \times 10^{-6}$ (semana 5)	Phonethswath <i>et al.</i> 2008
DMBA	75 mg/kg por triplicado			$14 \pm 21 \times 10^{-6}$	133×10^{-6} (semana 5)	
ENU	8.9, 35.6 y 142.4 mg/kg vía oral	Sangre periférica de ratas macho Cepa F344	anti CD59 anti CD45	3.9 a 21.4×10^{-6}	$57.3, 171.7$ y 624.6×10^{-6} para $8.9, 35.6$ y 142.4 mg/kg, respectivamente	Miura <i>et al.</i> 2009
ENU	40 mg/kg i.p.	Sangre periférica de <i>Macaca mulatta</i>	anti CD59 anti CD45	$7.8 \pm 4.2 \times 10^{-6}$	46.5×10^{-6}	Dobrovolsky <i>et al.</i> 2009
N-metil-n-Nitrosourea (MNU)	15 y 30 mg/kg	Sangre periférica de ratas macho cepa Wistar	anti CD59 SYTO13	1.3 a 5.1×10^{-6}	$215 \pm 85 \times 10^{-6}$ (semana 4)	Phonethpswath <i>et al.</i> 2010

si puede ser usado para estudiar mutaciones en células no eritroides como por ejemplo, en hepatocitos (Dertinger *et al.* 2014).

Se realizó un estudio de colaboración internacional, en 14 laboratorios para evaluar la reproducibilidad del ensayo de mutación *in vivo* basado en el conteo de eritrocitos de rata CD59 (-). Se utilizó el anticuerpo anti CD59, el colorante SYTO 13, y la citometría de flujo. El objetivo fue proporcionar un intervalo de frecuencias del fenotipo mutante, se usaron ratas macho expuestas a ENU a través de una sonda nasogástrica por tres días consecutivos (días 1-3). Cada laboratorio administró 0, 20, y 40 mg de ENU/kg/día (n=5 por grupo). Se siguió un protocolo establecido para el procesamiento y la adquisición de la muestra así como para la recopilación de datos. Los resultados de este estudio demostraron que la

metodología es reproducible, ya que éstos fueron similares entre los diferentes laboratorios (Dertinger *et al.* 2011a).

Este estudio representó el primer paso en la evaluación sistemática de las virtudes y limitaciones del método (OECD, 2005). Como parte de la Etapa III de validación, se llevaron a cabo estudios de genotoxicidad en ratas tratadas con benzo (a) pireno (BaP). Los resultados obtenidos mostraron aumentos en las frecuencias de mutantes relacionados con la dosis y el tiempo. Las respuestas de los RET fueron mayores que las de los E. Los resultados indican que las células eritroides son un buen modelo de estudio y apoyan su integración en estudios de mutación genética (Bhalli *et al.* 2011).

El Instituto de Salud y de Ciencias Ambientales (HESI, por sus siglas en inglés) y el Instituto

Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, por sus siglas en inglés), integraron un comité para valorar la utilidad potencial del modelo de evaluación mutacional *in vivo*, (Etapa IV). Este grupo de expertos llegó a la conclusión de que el *Pig-A* es adecuado para evaluar mutagenicidad *in vivo*, ya sea como un estudio independiente o integrado en los estudios de toxicología de dosis repetidas, lo que apoya aún más la validación del modelo (Schuler *et al.* 2011).

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ENSAYO *Pig-a* / *PIG-A*

Permite evaluar productos y tomar decisiones regulatorias, ya que mide la inducción de mutaciones en un determinado gen en lugar de medir sólo el daño primario en el ADN. Otros análisis de mutación de genes *in vivo* tienen la desventaja de ser costosos y necesitan tiempos prolongados, además de que requieren el uso de animales transgénicos.

Las características básicas que dan solidez a este ensayo son:

1. Se integra fácilmente en los estudios de toxicidad estándar.
2. Sustituye el uso de costosos roedores especializados.
3. Los resultados se obtienen el mismo día y en cuestión de horas.
4. Se puede usar en distintos tipos celulares incluyendo los linfocitos.

5. Es rentable y práctico.
6. El gen se encuentra localizado en el cromosoma X por lo que hombres y mujeres tienen sólo una copia funcional. A diferencia de los genes autosómicos con dos alelos, sólo se requiere un único evento de mutación para afectar la función del gen y producir el fenotipo característico.

Hasta el momento el ensayo se ha probado ampliamente en células sanguíneas y en líneas celulares linfoblastoides. En el análisis de resultados de estos estudios hay que considerar las características del sistema hematopoyético; ya que a partir de un análisis de células sanguíneas maduras GPI (-), no es posible saber en qué etapa ocurrió la mutación, puesto que se puede producir en una célula troncal hematopoyética multipotencial, o en células progenitoras (Dingli *et al.* 2008, Miura *et al.* 2009). En algunos casos, esta situación se puede inferir a partir de la cinética del número de células mutantes: por ejemplo, si después de una sola dosis de mutágeno hay un marcado aumento en la frecuencia de mutantes, y éste se mantiene durante varios meses, es razonable suponer que la mutación ha tenido lugar en una célula troncal hematopoyética (Araten *et al.* 1999). Este evento originará muchas más células maduras mutantes, que una mutación que ha tenido lugar en un eritroblasto, y esto afectará el recuento de células mutantes en la sangre periférica.

En el **cuadro IV** se muestran las fortalezas y debilidades de los estudios efectuados con citometría de flujo para integrar al *PIG-A* como prueba

CUADRO IV. FORTALEZAS Y DEBILIDADES DEL ENSAYO *Pig-a* USANDO CITOMETRÍA DE FLUJO

Fortalezas	Debilidades
Se realiza en diferentes especies y tipos celulares.	La mayoría de los datos publicados están en E y RET de rata, sin embargo también existen reportes en los que se usan otros tipos celulares.
Se obtienen datos en pocas horas y no se requieren cultivos celulares.	Se requiere un equipo relativamente caro y experiencia en su uso.
Es sensible, detecta frecuencias bajas de mutantes basales ($<5 \times 10^{-6}$ en E y RET de roedores).	Los análisis en E son rápidos, sin embargo en RET se requiere más tiempo (15 minutos)
Para el análisis con RET y E se requiere de un volumen pequeño de sangre periférica (50 μ L), lo que hace posible el muestreo repetitivo en roedores.	Los ensayos con leucocitos de roedores requieren sacrificar el animal para obtener un número suficiente de células.
Los análisis con RET o E, permiten hacer estudios de exposición crónica y subcrónica y dar seguimiento en los mismos animales, por periodos largos de tiempo.	Los ensayos realizados con E y RET de mamíferos no permiten la caracterización del genotipo.
La mayoría de los reactivos están disponibles en el mercado y se están estandarizando los protocolos.	Se requiere continuar los estudios para evaluar la sensibilidad y especificidad del ensayo

reglamentaria en el campo de la toxicología (Dobrovolsky *et al.* 2010).

PERSPECTIVAS DEL ENSAYO

Este método cumple el objetivo principal de las pruebas de reglamentación de toxicidad genética, al evaluar la mutación genética en lugar del daño en el ADN. El estudio basado en el análisis de E y RET por citometría de flujo es rápido, relativamente fácil de realizar, económico y práctico. Se ha evidenciado que puede utilizarse para medir toxicidad crónica y subcrónica sin alterar otros criterios de valoración, como por ejemplo el metabolismo de fármacos. (Dertinger *et al.* 2010). Debido a que la cinética de manifestación de mutantes es relativamente rápida, los análisis llevados a cabo en RET, son los más útiles para la mayoría de las aplicaciones reguladoras.

Un inconveniente al trabajar con eritrocitos de mamíferos es que al carecer de núcleo ya no es posible ubicar la mutación. Por lo anterior se ha propuesto también analizar células nucleadas (Dobrovolsky *et al.* 2010).

Es necesario seguir trabajando a nivel molecular para relacionar la ausencia de CD59 con los cambios moleculares en el *PIG-A*. También es importante evaluar la sensibilidad y especificidad del ensayo, para lo cual se propone probar mutágenos débiles y no mutágenos, así como optimizar el diseño de estos estudios.

EL ENSAYO *Pig-a* EN MÉXICO

En 2012, en el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, se empleó por primera vez el protocolo descrito por Phonethepswath *et al.* (2010) para la evaluación de mutaciones somáticas *in vivo*, por medio del *Pig-a*. Se utilizó sangre periférica de ratas macho de la cepa Wistar de 14 días de edad, que fueron expuestas al mutágeno ENU en dosis de 30 y 60 mg/kg de peso. Se efectuó la tinción diferencial de reticulocitos y eritrocitos maduros usando SYTO 13 y el anticuerpo (anti CD59) para identificar el fenotipo CD59 (-). Las frecuencias de mutantes *Pig-a* fueron analizadas en un millón de células (Pacheco 2012).

La frecuencia basal de RET mutantes (RET-MUT) fue $5-10 \times 10^{-6}$ y de E mutantes (E-MUT) fue de $1-4 \times 10^{-6}$. Después de la administración de ENU las frecuencias aumentaron significativamente de acuerdo con la dosis administrada. En la semana 8 (56 días de edad) las frecuencias para RET-MUT fueron

$448-469 \times 10^{-6}$ con la dosis de 30 mg y $586-650 \times 10^{-6}$ con la dosis de 60 mg. Para E-MUT las frecuencias fueron de $319-353 \times 10^{-6}$ (dosis 30 mg) y $500-555 \times 10^{-6}$ (dosis 60 mg). En la **figura 2**, se muestran las gráficas de puntos de los resultados obtenidos.

En México el ensayo *Pig-a* se introdujo recientemente como método de evaluación genotóxica. Nuestra experiencia muestra que es una herramienta que permite analizar el daño génico, en las muestras de sangre periférica de ratas jóvenes (Pacheco 2012).

Protocolo básico para evaluación de la frecuencia de mutaciones *Pig-a* en eritrocitos

Para la valoración de agentes químicos *in vivo* en roedores (rata cepas Wistar, Sprague Dawley y Ficher 344 y ratones CD-1) se recomienda una n=6 en los siguientes grupos:

Grupo testigo (administrado con el vehículo).

Grupo experimental 1 (administrado con una dosis baja del agente a evaluar).

Grupo experimental 2 (administrado con una dosis media del agente a evaluar).

Grupo experimental 3 (administrado con una dosis alta del agente a evaluar).

La elección de las dosis depende del tipo de agente que se pretende evaluar; la vía de administración más común es la oral.

Se sugiere que los tiempos de monitoreo de la frecuencia de mutantes sean prolongados (de 6-8 semanas después de la administración del agente químico).

La tinción de las muestras requiere de anticuerpos conjugados con fluorocromos para identificar a las proteínas CD24, CD55 o CD59 y para diferenciar entre RET y E se propone emplear SYTO 13. Para la adquisición de las muestras los modelos de citómetro más usados son: FacsCalibur, FacsCanto y FacsDiva.

De acuerdo con Dobrovolsky *et al.* (2010), el tiempo estimado para realizar el ensayo es de 3-6 horas.

Comparando el tiempo e implícitamente el costo del *Pig-a*, con los ensayos transgénicos, estos últimos requieren 2 o más días y si se compara con HPRT, este método demora 2 semanas para la obtención de resultados. La prueba *Pig-a* tiene la ventaja de ser rápida al obtener resultados en un tiempo de alrededor de 6 horas. Si se cuenta con un citómetro de flujo, el costo es relativamente accesible, ya que sólo se requiere de anticuerpos y colorantes de ácidos nucleicos.

La experiencia colectiva y la propia han evidenciado que el ensayo de mutación *in vivo* *Pig-a* tiene

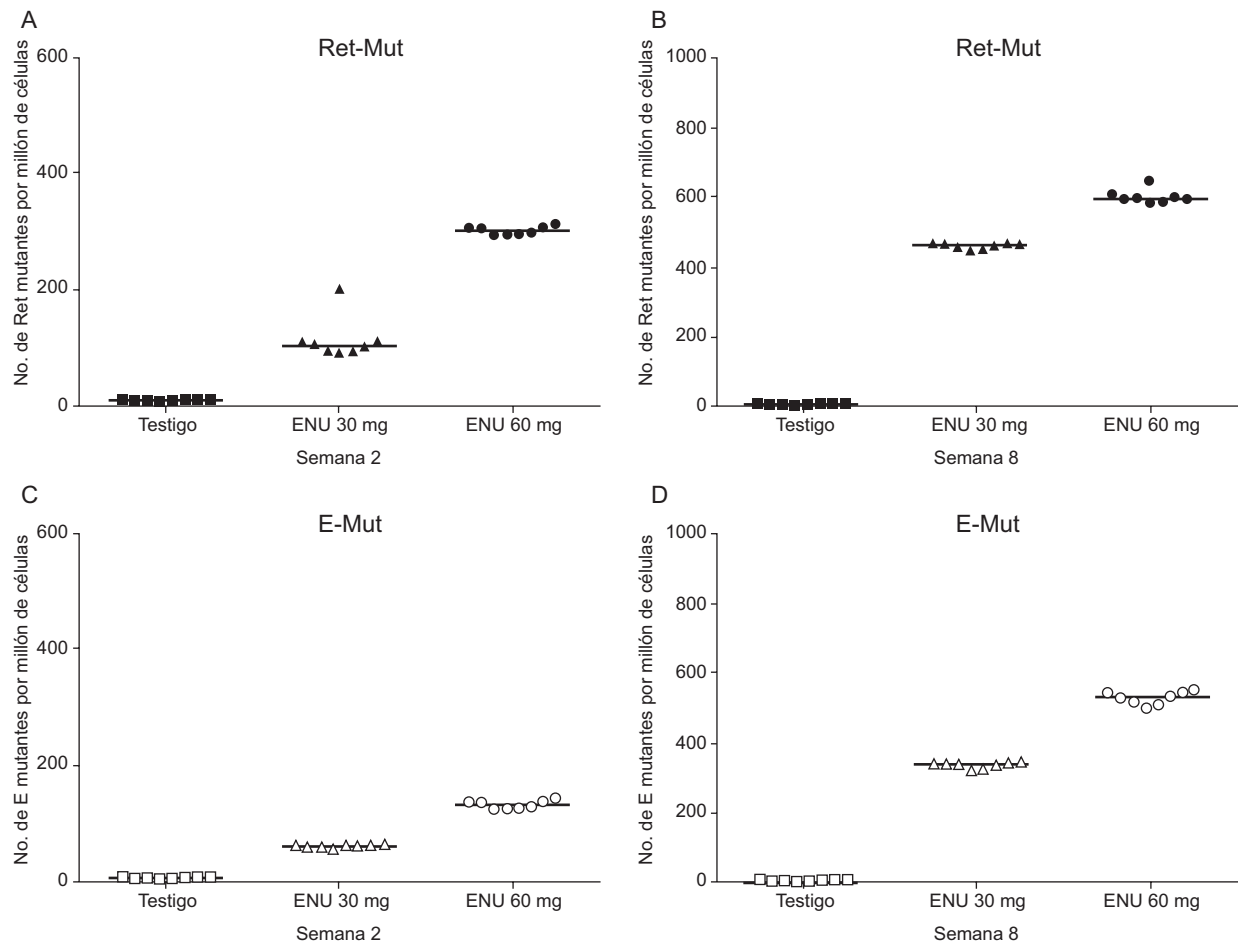


Fig. 2. Medianas de las frecuencias de mutantes en los grupos testigo y tratados con dosis de 30 y 60 mg de ENU. **A:** frecuencia de RET-MUT en la semana 2, después de la administración de ENU. **B:** inducción de mutantes RET-MUT en la semana 8. **C:** frecuencia de E-MUT en la semana 2 y **D:** frecuencia de E-MUT en la semana 8. Las frecuencias se calcularon por millón de células.

gran potencial para identificar frecuencias de mutantes con dosis bajas y altas de agentes mutagénicos de acción directa. Sin duda alguna es una herramienta útil que puede complementar otros estudios citogenéticos.

AGRADECIMIENTOS

Beca CONACyT para estudios de Posgrado No. de apoyo: 351641. Apoyo del Programa para el Mejoramiento del Profesorado, PROMEP/103.5/13/6732. Apoyo del CONACyT, proyecto Ciencia Básica.

REFERENCIAS

Abramsson-Zetterberg L., Zetterberg G., Bergqvist M. y Grawé J. (2000). Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in

transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 36, 22-31.

Araten D.J., Nafa K., Pakdeesuwan K. y 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.

Araten D.J., Bessler M., McKenzie S., Castro-Malaspina H., Childs B.H., Boulad F., Karadimitris A., Notaro R. y Luzzatto L. (2002). Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. *Leukemia* 16, 2243-2248.

Araten D.J., Golde D.W., Zhang R.H., Thaler H.T., Gargiulo L., Notaro R. y Luzzatto L. (2005). A quantitative measurement of the human somatic mutation rate. *Cancer Res.* 65, 8111-8117.

Blakey D., Galloway S.M., Kirkland D.J. y MacGregor J.T. (2008). Regulatory aspects of genotoxicity testing:

- from hazard identification to risk assessment. *Mutat. Res.* 657, 84-90.
- Bhalli J.A., Shaddock J.G., Pearce M.G., Dobrovolsky V.N., Cao X., Heflich R.H. y Vohr H.W. (2011). Report on stage III *Pig-a* mutation assays using benzo[a]pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 731-737.
- Brodsky R.A. (2008). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: stem cells and clonality. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2008, 111-115.
- Bromley S.K., Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M. y Dustin M.L. (2001). The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 375-396.
- Brown D.A. y Rose J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Bryce S.M., Bemis J.C. y Dertinger S.D. (2008). *In vivo* mutation assay based on the endogenous *Pig-a* locus. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 256-264.
- 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.
- Danielsen E.M. y van Deurs B. (1995). A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 131, 939-950.
- de Macedo C.S., Shams-Eldin H., Smith K.T., Schwarz T.R. y Azzouz N. (2003). Inhibitors of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie.* 85, 465-472.
- Dertinger S.D., Phonethepswath S., Franklin D., Weller P., Torous D.K., Bryce S.M., Avlasevich S., Bemis J.C., Hyrien O., Palis J. y MacGregor J.T. (2010). Integration of mutation and chromosomal damage endpoints into 28-day repeat dose toxicology studies. *Toxicol. Sci.* 115, 401-411.
- Dertinger S.D., Phonethepswath S., Weller P., Nicolette J., Murray J., Sonders P., Vohr H.W., Shi J., Krsmanovic L., Gleason C., Custer L., Henwood A., Sweder K., Stankowski L.F. Jr., Roberts D.J., Giddings A., Kenny J., Lynch A.M., Defrain C., Nesslany F., van der Leede B.J., Van Doninck T., Schuermans A., Tanaka K., Hiwata Y., Tajima O., Wilde E., Elhajouji A., Gunther W.C., Thiffeault C.J., Shutsky T.J., Fiedler R.D., Kimoto T., Bhalli J.A., Heflich R. H. y MacGregor J.T. (2011a). International *Pig-a* gene mutation assay trial: evaluation of transferability across 14 laboratories. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 690-698.
- Dertinger S.D., Phonethepswath S., Weller P., Avlasevich S., Torous D.K., Mereness J.A., Bryce S.M., Bemis J.C., Bell S., Portugal S., Aylott M. y MacGregor J.T. (2011b). 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.D., Phonethepswath S., Avlasevich S., Torous D., Mereness J., Cottom J., Bemis J. y MacGregor J. (2014). *Pig-a* gene mutation and micronucleated reticulocyte induction in rats exposed to tumorigenic doses of the leukemogenic agents chlorambucil, thiotepa, melphalan, and 1,3-propane sultone. *Environ. Mol. Mutagen.* 55, 299-308.
- DH Toxicology Unit/Secretariat. (2010). Committee on Mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment. The Development and Validation of a Mutation Assay using the *PIG-A* gene. [en línea] <http://www.iacom.org.uk/papers/13/05/2013>.
- Dingli D., Luzzatto L. y Pacheco J.M. (2008). Neutral evolution in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 18496-18500.
- Dobrovolsky V.N., Shaddock J.G., Mittelstaedt R.A., Manjanatha M.G., Miura D., Uchikawa M., Mattison D.R. y Morris S.M. (2009). Evaluation of *Macaca mulatta* as a model for genotoxicity studies. *Mutat. Res.* 673, 21-28.
- Dobrovolsky V.N., Miura D., Heflich R.H. y Dertinger S.D. (2010). The *in vivo* *Pig-a* gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 825-835.
- Ferguson M.A. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* 112, 2799-2809.
- Genetics Home Reference (2013). National Library of Medicine's [en línea] <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIGA> 17/11/2013.
- Harder T. y Simons K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.
- Head P.B., Patel H.H e Insel A.P. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function. *Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling.* *Biochim. Biophys. Acta.* 1838, 532-545.
- Heflich R.H., Beranek D.T., Kodell R.L. y Morris S.M. (1982). Induction of mutations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by ethylating agents. *Mutat. Res.* 106, 147-161.
- Hernández-Campo P.M., Almeida J. y Orfao A. (2008). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med. Clin. (Barc).* 131, 617-630.

- Jasinski M., Keller P., Fujiwara Y., Orkin S.H. y Bessler M. (2001). GATA1-Cre mediates *Pig a* gene inactivation in the erythroid/megakaryocytic lineage and leads to circulating red cells with a partial deficiency in glycosylphosphatidylinositol-linked proteins (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type II cells). *Blood* 98, 2248-2255.
- Kinoshita T., Ohishi K. y Takeda J. (1997). GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *J. Biochem.* 122, 251-257.
- Kinoshita T., Fujita M. y Maeda Y. (2008). Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J. Biochem.* 144, 287-294.
- Kirkland D. y Speit G. (2008). Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*. *Mutat. Res.* 654, 114-132.
- Krishna G. y Hayashi M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455, 155-166.
- Maciejewski J.P., Sloand E.M., Sato T., Anderson S. y Young N.S. (1997). Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia is not associated with a selective proliferative defect in the glycosylphosphatidylinositol anchored protein-deficient clone. *Blood* 89, 1173-1181.
- McConville M.J. y Ferguson M.A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294, 305-324.
- Miura D., Dobrovolsky V.N., Kasahara Y., Katsuura Y. y Heflich R.H. (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 V.N., Mittelstaedt R.A., Kasahara Y., Katsuura Y. y Heflich R.H. (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.
- Miura D., Dobrovolsky V.N., Kimoto T., Kasahara Y. y Heflich R.H. (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. *Mutat. Res.* 677, 86-92.
- Nosjean O., Briolay A. y Roux B. (1997). Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1331, 153-186.
- OECD, Series on Testing and Assessment, Number 34. (2005). Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development. [en línea] <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmentpublicationsbynumber.htm> 15/10/ 2013.
- Orlean P. (1990). Dolichol phosphate mannose synthase is required *in vivo* for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5796-5805.
- Pacheco Martínez M.M. (2012). Detección de mutación somática *Pig-a* en eritrocitos de sangre periférica de ratas desnutridas. Tesis de Maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Paulick M.G. y Bertozzi C.R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochem.* 47, 6991-7000.
- Peruzzi B., Araten D.J., Notaro R. y 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*. *Mutat. Res.* 705, 3-10.
- Phonetheswath S., Bryce S.M., Bemis J.C. y Dertinger S.D. (2008). Erythrocyte-based *Pig-a* gene mutation assay: demonstration of cross-species potential. *Mutat. Res.* 657, 122-126.
- Phonetheswath S., Franklin D., Torous D.K., Bryce S.M., Bemis J.C., Raja S., Avlasevich S., Weller P., Hyrien O., Palis J., Macgregor J.T. y Dertinger S.D. (2010). *Pig-a* mutation: kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens. *Toxicol. Sci.* 114, 59-70.
- Pike L.J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 47, 1597-1598.
- Potteger L.H., Bus J.S. y Gllapudi B.B. (2007). Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation Part VI: When salt and sugar and vegetables are positive, how can genotoxicity data serve to inform risk assessment? *Toxicol. Sci.* 98, 327-331.
- Robinson P.J. (1991). Phosphatidylinositol membrane anchors and T-cell activation. *Immunol. Today.* 12, 35-41.
- Rosse W. (1997). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine.* 76, 63-93.
- Ross C.D., Lim C., y Fox M.H. (2005). An assay to measure CD59 mutations in CHO AL cells using flow cytometry. *Cytometry.* 66, 85-90.
- Schuler M., Gollapudi B.B., Thybaud V. y Kim J.H. (2011). Need and potential value of the *Pig-a in vivo* mutation

- assay-a HESI perspective. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 685-689.
- Stevens V.L. y Raetz C.R. (1991). Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. *J. Biol. Chem.* 266, 10039-10042.
- Sugita Y., Mazda T. y 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, 589-592.
- Takahashi M., Takeda J., Hirose S., Hyman R., Inoue N., Miyata T., Ueda E., Kitani T., Medof M.E. y Kinoshita T. (1993). Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Exp. Med.* 177, 517-521.
- Tomita M. (1999). Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1455, 269-286.
- Tremml G., Dominguez C., Rosti V., Zhang Z., Pandolfi P.P., Keller P. y Bessler M. (1999). Increased sensitivity to complement and a decreased red blood cell life span in mice mosaic for a nonfunctional *Pig a* gene. *Blood.* 94, 2945-2954.
- Walter E.I., Roberts W.L., Rosenberry T.L., Ratnoff W.D. y Medof M.E. (1990). Structural basis for variations in the sensitivity of human decay accelerating factor to phosphatidylinositol-specific phospholipase C cleavage. *J. Immunol.* 144, 1030-1036.
- Yamada N., Miyata T., Maeda K., Kitani T., Takeda J. y Kinoshita T. (1995). Somatic mutations of the *PIG-A* gene found in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85, 885-892.

Research Article

CD48-Deficient T-Lymphocytes from DMBA-Treated Rats Have De Novo Mutations in the Endogenous *Pig-a* Gene

Vasily N. Dobrovolsky,^{1*} Javier Revollo,¹ Mason G. Pearce,¹
M. Monserrat Pacheco-Martinez,² and Haixia Lin¹

¹Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, Arkansas

²Departamento De Ciencias De La Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

A major question concerning the scientific and regulatory acceptance of the rodent red blood cell-based *Pig-a* gene mutation assay is the extent to which mutants identified by their phenotype in the assay are caused by mutations in the *Pig-a* gene. In this study, we identified T-lymphocytes deficient for the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface marker, CD48, in control and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)-treated rats using a flow cytometric assay and determined the spectra of mutations in the endogenous *Pig-a* gene in these cells. CD48-deficient T-cells were seeded by sorting at one cell per well into 96-well plates, expanded into clones, and exons of their genomic *Pig-a* were sequenced. The majority (78%) of CD48-deficient T-cell clones from DMBA-treated rats had mutations in the *Pig-a* gene. The spectrum of DMBA-induced *Pig-a* mutations was dominated by mutations at A:T, with the mutated A

being on the nontranscribed strand and A→T transversion being the most frequent change. The spectrum of *Pig-a* mutations in DMBA-treated rats was different from the spectrum of *Pig-a* mutations in *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)-treated rats, but similar to the spectrum of DMBA mutations for another endogenous X-linked gene, *Hprt*. Only 15% of CD48-deficient mutants from control animals contained *Pig-a* mutations; T-cell biology may be responsible for a relatively large fraction of false *Pig-a* mutant lymphocytes in control animals. Among the verified mutants from control rats, the most common were frameshifts and deletions. The differences in the spectra of spontaneous, DMBA-, and ENU-induced *Pig-a* mutations suggest that the flow cytometric *Pig-a* assay detects de novo mutation in the endogenous *Pig-a* gene. *Environ. Mol. Mutagen.* 56:674–683, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor; flow cytometry; cell sorting; sequencing

INTRODUCTION

The *Pig-a* gene mutation assay was developed from basic research on the molecular nature of an acquired human genetic disorder, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). PNH is characterized by a greatly expanded fraction of peripheral blood cells that are deficient in surface markers anchored by glycosylphosphatidylinositol (GPI); in the majority of cases, the deficiency is owing to mutation in the endogenous *PIG-A* gene in precursor cells of the bone marrow [Inoue et al., 2003]. *PIG-A* is an X-linked gene that is involved in the synthesis of GPI anchors [Kinoshita et al., 2008]. An inactivating mutation in the single functional copy of the *PIG-A* gene makes the cell deficient for GPI anchors and deficient for markers that are normally tethered by GPI to the

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

The views presented in this article do not necessarily represent those of the US Food and Drug Administration.

Grant sponsors: The Oak Ridge Institute for Science and Education (ORISE) through an interagency agreement between the U.S. Department of Energy and the U.S. FDA; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and ORISE.

*Correspondence to: Vasily N. Dobrovolsky, Division of Genetic and Molecular Toxicology and U.S. Food and Drug Administration, 3900 NCTR Rd., HFT-120, Jefferson, AR 72079.

E-mail: vasily.dobrovolsky@fda.hhs.gov

Received 19 February 2015; provisionally accepted 18 May 2015; and in final form 19 May 2015

DOI 10.1002/em.21959

Published online 14 July 2015 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

exoplasmic surface of the cell (the protein markers may continue to be synthesized, but they remain trapped inside GPI-deficient cells). A simple flow cytometric assay for quantitating the fraction of marker-deficient *PIG-A* mutant cells is used for confirming a diagnosis of PNH [Hall and Rosse, 1996]. Araten et al. [1999] proposed that flow cytometry and the basic approach for the PNH diagnostic assay could be used for monitoring humans for somatic mutation, with deficiency for a ubiquitous GPI-anchored marker or markers serving as the reporter of mutation in the *PIG-A* gene.

Subsequently, the original human assay was further explored and analogous assays were developed for detecting relatively rare spontaneous and treatment-induced mutation in the *Pig-a* gene of laboratory animals (*PIG-A* in humans, *Pig-a* in animals) [Bryce et al., 2008; Miura et al., 2008; Phonetheswath et al., 2008; Dobrovolsky et al., 2009, 2011]. Currently, assays measuring mutation in the red blood cells (RBCs) of rats are the best developed, with various rat RBC *Pig-a* assays having been evaluated in interlaboratory trials [Dertinger et al., 2011; Kimoto et al., 2013]. The rat RBC *Pig-a* assay has been recommended as a potential test for measuring *in vivo* gene mutation in regulatory genotoxicity safety evaluations [Dobrovolsky et al., 2010a; Gollapudi et al., 2015]. Rodent flow cytometric RBC *Pig-a* assays have performed exceptionally well for detecting mutagens and for differentiating between structurally related genotoxic carcinogens and nongenotoxic carcinogens and noncarcinogens [Torous et al., 2012; Bemis et al., 2015].

A major hurdle for the regulatory acceptance of the *Pig-a* assay, however, is uncertainty over whether or not individual marker-deficient cells identified by flow cytometry as “phenotypic mutants” in the assay indeed are caused by mutations in the *Pig-a* gene. The relationship between marker deficiency and *PIG-A* mutation is well established for PNH, but marker deficiency in animals treated with mutagens could be caused by events other than mutation in the *Pig-a* gene, for example, by epigenetic silencing (repression of expression) of the *Pig-a* gene, or by mutations and/or epigenetic events in other genes involved in GPI synthesis, or in the gene(s) for the GPI-linked marker that is interrogated in the assay. Indeed, several mutations in genes involved with GPI synthesis, other than *PIG-A*, have been implicated in human genetic diseases with “PNH-like” phenotypes [Almeida et al., 2006, 2009; Krawitz et al., 2012, 2013a, 2013b]. Epigenetic events can occur in response to the treatment or can be a consequence of the natural life cycle of the cell. These effects could be permanent or transient. All the aforementioned events may negatively affect the measurement of a true *Pig-a* mutant frequency.

Part of the validation process for regulatory assays is providing evidence, indicating that the assay measures what it is designed to measure (Organisation for Economic Co-operation and Development, Guidance Document No. 34; available at www.oecd.org). In the case of

the rat *Pig-a* assay, this means establishing the relationship between the altered cell-surface phenotype measured in the assay and mutation in the *Pig-a* gene at the level of individual cells [Gollapudi et al., 2015]. Such a relationship cannot be directly traced in DNA- and mRNA-free RBCs, but it can be established for peripheral white blood cells or for the appropriate bone marrow-resident nucleated precursors of RBCs.

Previously, we determined that a high percentage of flow cytometry-identified CD48-deficient peripheral T-cells from rats treated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) do have mutations in the *Pig-a* gene [Revollo et al., 2015]. CD48 is a common GPI-anchored leukocyte surface marker. CD48-deficient cells were sorted on a fluorescence-activated cell sorter and clonally expanded. The majority of the resulting clones retained the CD48-deficient phenotype of the parental cells; and the spectrum of mutations in the *Pig-a* gene of these clones was consistent with the expected spectrum of ENU-induced mutations in an endogenous transcribed gene. This study characterizes CD48-deficient T-cells from rats treated with another potent mutagen, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA). DMBA induces a very distinct spectrum of mutations in eukaryotic cells, different from ENU-induced mutations. In addition, the nature of CD48-deficient T-cells from vehicle-control rats was investigated to determine the types of spontaneous *Pig-a* mutants detected by the assay.

MATERIALS AND METHODS

Key Reagents and Consumables

DMBA, ionomycin, phorbol ester myristate acetate (PMA), and sesame oil were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). MicroFlow® PLUS-R *in vivo* Micronucleus Analysis Kit was from Litron Laboratories (Rochester, NY). Mg, Ca-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), and RPMI1640 were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Fetal bovine serum (FBS) was from Atlanta Biologicals (Lawrenceville, GA); FBS was heat-inactivated in small batches at 56°C for 30 min and stored at -20°C. Lympholyte®-R was from Cedarlane (Burlington, NC). 10× RBC Lysis Buffer, PE-conjugated anti-rat CD48 antibody, and APC-conjugated anti-rat TCRαβ antibody were from BioLegend (San Diego, CA). Concanavalin-A-containing Rat T-STIM supplement, APC-conjugated HIS49 anti-rat erythroid antibody, 7AAD viability stain, and PE-conjugated anti-rat CD59 antibody were from BD Biosciences (Milpitas, CA). 70-μm mesh cell strainer inserts for 50-mL tubes and 5-mL flow tubes with 35-μm mesh strainer caps were purchased from Falcon (Tewksbury, MA). Anti-PE superparamagnetic beads, LS MACS magnetic separation columns, and a Quadro MACS magnet were from Miltenyi Biotec (Auburn, CA). The RNeasy (Plus) mini kit, Hot StarTaq kit, and QIAquick PCR purification kit were acquired from Qiagen (Valencia, CA). Individual 10 mM dNTPs, BigDye® Terminator v.3.1 reagent, and BigDyeXTerminator purification kit were from ABI/Invitrogen (Carlsbad, CA).

Animals and Treatment with DMBA

All animal procedures were reviewed and approved by the NCTR Institutional Animal Care and Use Committee. The complete outline of

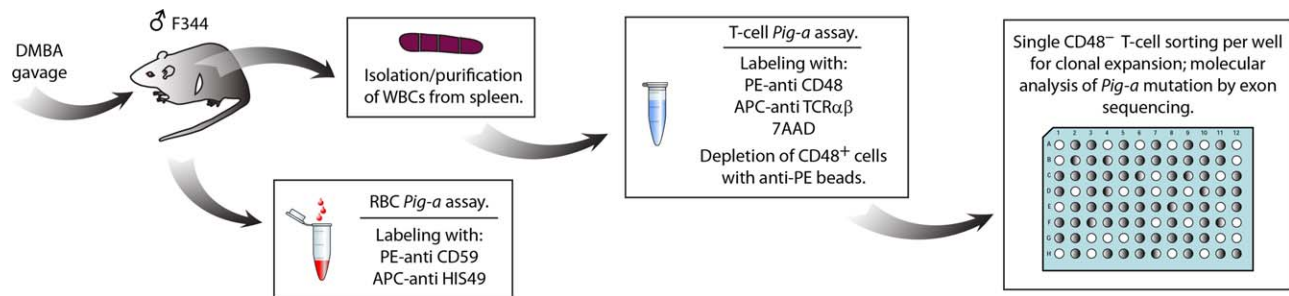


Fig. 1. Outline of the experiment.

the experiment from the treatment to sequencing is shown in Figure 1. Twelve F344 male rats were received from the NCTR breeding facility as weanlings at 3 weeks of age. The animals were housed two per cage with food and water ad libitum, and a 12-hr on/off light cycle. At 8–9 weeks of age, six rats were treated by gavage once every day for 3 days with a freshly prepared solution of 5 mg/mL DMBA in sesame oil. The stock DMBA solution was administered at 5 mL/kg to achieve a daily dose of 25 mg/kg, and a final cumulative dose of 75 mg/kg. The vehicle-control animals were gavaged three times with equivalent volumes of pure sesame oil. The first day of gavage was designated as Day 1. Peripheral blood was collected from the tail vein of all animals on Day 4 for the micronucleus assay and on Day 35 for the RBC *Pig-a* assay. Then, the animals were euthanized by CO₂ in pairs (one DMBA-treated and one vehicle-control) on Days 37, 46, 53, 60, 78, and 84 for the lymphocyte *Pig-a* assay and mutant cell sorting.

Micronucleus Assay

The frequencies of micronucleated (MN) reticulocytes were determined using the MicroFlow[®] PLUS-R kit. In brief, 100 μ L of whole blood was collected from the tail vein, mixed with anticoagulant from the kit, and preserved in methanol by following the manufacturer's instructions, but with the labeling reactions scaled down 50%. The analysis occurred on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Milpitas, CA).

RBC Flow Cytometry Assay

The RBC *Pig-a* assay was performed using erythroid-specific antibodies similarly to the previously described methods [Dobrovolsky et al., 2010b, 2014]. Briefly, 6 μ L of a 1:1 mixture of peripheral blood:anticoagulant was labeled in a reaction containing 190 μ L of DPBS/FBS (2% FBS in DPBS; v/v), 0.5 μ L of APC-HIS49, and 4 μ L of PE-anti-CD59; after 30-min incubation at room temperature in the dark, the cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 500 μ L of DPBS/FBS. One million HIS49-positive RBCs were interrogated on a FACSAria I flow cytometer (BD Biosciences, Milpitas, CA) for determining the frequency of CD59-deficient mutant RBCs. The gate for *Pig-a* mutant CD59-deficient RBCs was determined using a mutant mimic control—a blood sample labeled with APC-HIS49 only.

T-Cell Flow Cytometry Assay

T-cell analyses and magnetic enrichment were performed as described earlier [Revollo et al., 2015]. Briefly, spleens were aseptically removed from the rats; the spleen cells were released into RPMI1640 medium and centrifuged on a Lympholyte[®]-R density gradient to separate mononuclear cells (MNCs) from bulk RBCs. The remaining RBCs were eliminated from the MNC fraction using 1 \times RBC lysis buffer.

After two washes with DPBS/FBS, the purified MNCs from one spleen were resuspended in 2 mL of DPBS/FBS in a 50-mL tube and the cell concentrations were determined on a Z1 Coulter[®] Particle Counter (Beckman-Coulter, Indianapolis, IN). The cell numbers were adjusted to 25–30 \times 10⁶ cells/mL by adding 0.8–2.5 mL of DPBS/FBS and filtered through a 70- μ m mesh into a fresh 50-mL tube.

For the standard T-cell assay, 100 μ L of purified MNCs was added into a mixture of 100 μ L of DPBS/FBS, 3 μ L of PE-anti-CD48, and 3 μ L of APC-anti TCR. After 30-min incubation at room temperature in the dark, the labeled cells were pelleted by centrifugation, resuspended in 500 μ L of DPBS/FBS, mixed with 20 μ L of 7AAD, filtered through 35- μ m mesh into 5-mL tubes, and analyzed on a FACSAria I flow cytometer. The number of 7AAD-negative, TCR-positive, CD48-negative mutants were counted among 0.5–1 \times 10⁶ 7AAD-negative, TCR-positive wild-type (WT) T-cells. The gating for the mutant cells was determined using a mutant-mimic sample—cells labeled with everything but anti-CD48.

Immunomagnetic Separation and Sorting of CD48-Deficient T-Cells

For immunomagnetic depletion of WT cells (and enrichment for the fraction of CD48-deficient mutant cells), the standard labeling reactions were scaled up 10 \times and performed in duplicate, in two separate tubes. In each labeling tube, 1 mL of purified MNCs was mixed with 1 mL of DPBS/FBS, 30 μ L of PE-anti-CD48, and 30 μ L of APC-anti TCR. The labeled cells were diluted with 10 mL of DPBS/FBS, pelleted by centrifugation, and resuspended in 500 μ L of DPBS/FBS to which 50 μ L of anti-PE magnetic beads were added. The cells labeled with antibodies and beads were washed with DPBS/FBS, pelleted by centrifugation, resuspended in 2 mL of DPBS/FBS, and processed on an LS separation column mounted onto a Quadro MACS magnet. The flow-through fraction eluted in \sim 7 mL of DPBS/FBS was depleted of the majority of CD48-positive WT cells, or, in different words, enriched for CD48-deficient cells. The enriched CD48-deficient cells were pelleted and resuspended in 1 mL of DPBS/FBS, filtered into 5-mL tubes through the 35- μ m mesh top and 40 μ L of 7AAD was added. The contents of the two duplicate labeling reactions were combined and processed on a FACSAria I cell sorter using the same gating strategy as for the standard T-cell assay. The CD48-deficient T-cells were sorted one per well using the single-cell cytometer purity mode into round bottom 96-well tissue culture plates (96-WPs) prefilled with 200 μ L of growth medium per well. RPMI1640-based growth medium was supplemented with rat T-STIM, ionomycin, and PMA (the complete composition of the growth medium can be found in the previously published study [Dobrovolsky et al., 2013]). The plates with sorted cells were cultured for 10–13 days at 37°C in humidified air supplemented with 5% of CO₂. At the end of the incubation period, the plates were inspected on an inverted tissue culture microscope, and wells containing expanded clones were

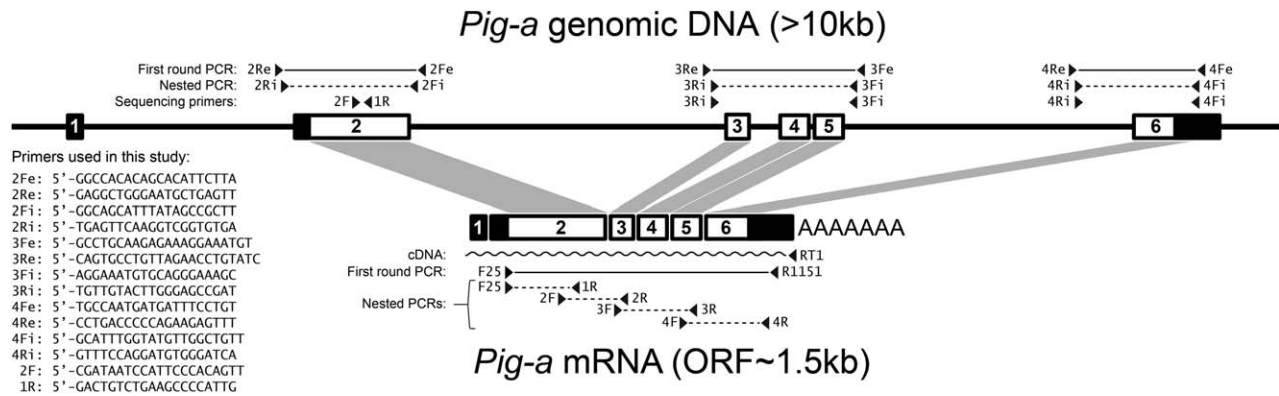


Fig. 2. Molecular analysis of *Pig-a* mutations in clones developed from sorted CD48-deficient T-cells. Intron/exon structure of the genomic *Pig-a* gene and the appropriately spliced *Pig-a* mRNA are shown. Numbered boxes represent exons of the *Pig-a* gene; noncoding (nontranslated) parts of exons are shown in solid black. The complete first exon and part of the second exon of the *Pig-a* gene are nontranslated. Black triangles “▶” represent primers employed in this study for amplification and sequencing of *Pig-a* exons from genomic DNA, and in the previous study [Revollo et al., 2015] for *Pig-a* cDNA synthesis and amplification/sequencing of its fragments. The positions of the primers relative to *Pig-a* genomic

DNA and mRNA/cDNA are shown in their 5' to 3' prime orientations. Synthesized *Pig-a* cDNA is shown by a wavy line; first-round PCR products are shown with solid lines and nested PCR products are shown with dashed lines; “e” in the primer name designates an external primer and “i” in the primer name designates an internal primer. The sequences of primers used for molecular analysis of the *Pig-a* gene in this study are shown in the inset on the left-hand side. Other primers were used in preliminary stages of the study for the analysis of *Pig-a* cDNA in a limited number of clones (see the text); the sequences of these primers can be found elsewhere [Miura et al., 2011].

identified. Expanded clones were washed with DPBS and frozen as pellets at -80°C until further processing.

Sequencing of the *Pig-a* Gene and Identification of Mutations

Nucleic acids were extracted from clones stored at -80°C using a column-based RNeasy (Plus) mini kit and by following the manufacturer's instructions for the extraction of RNA. The final product was eluted in a volume of 30 μL . The analysis of mutations in the *Pig-a* gene was performed either as described previously, via synthesis and amplification of *Pig-a* cDNA, followed by amplification and sequencing of nested fragments [Revollo et al., 2015], or using genomic DNA for amplification and sequencing of *Pig-a* exons covering the open-reading frame (Fig. 2). The entire *Pig-a* exon 2, exons 3 + 4 + 5, and part of exon 6 were amplified in three separate reactions using specific external primer pairs (i.e., 2Re and 2Fe, 3Re and 3Fe, 4Re and 4Fe), the HotStar-Taq kit, and a temperature profile of $95^{\circ}\text{C} \times 15 \text{ min} + (95^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ min} + 57^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ min} + 72^{\circ}\text{C} \times 2.5 \text{ min}) \times 40 + 4^{\circ}\text{C}$ soak (the positions and the sequences of primers are shown in Fig. 2). The amplification reactions contained 2 μL of nucleic acids extracted from a clone, 1 \times buffer (from the kit), 0.2 mM each dNTP, 1 μM of each primer, 1 U (0.2 μL) of Taq polymerase from the kit, and water to a final volume of 20 μL . The $\sim 1.5\text{-kb}$ amplification products were analyzed on 1% of agarose gels. If the amplified product was present as a single band in sufficient amount, then it was purified and sequenced on a 3130xL Genetic Analyzer (ABI) using standard BigDye[®] Terminator chemistry and the sequencing primers are shown in Figure 2. If the specific fragment was poorly amplified (i.e., weak/invisible band or smear), then the first-round PCR was diluted 1:100 with water, and a nested PCR was performed with an appropriate internal primer pair (i.e., 2Ri and 2Fi, or 3Ri and 3Fi, or 4Ri and 4Fi, respectively). The nested reactions contained 2 μL of a 1:100 dilution of the DNA template amplified in the first-round PCR, 1 \times buffer (from HotStarTaq kit), 0.2 mM each dNTP, 1 μM of each primer, 1 U (0.2 μL) of Taq polymerase from the kit, and water to a final volume of 20 μL . The nested PCR temperature profile had only 30 cycles: $95^{\circ}\text{C} \times 15 \text{ min} + (95^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ min} + 57^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ min} + 72^{\circ}\text{C} \times$

2.5 min) $\times 30 + 4^{\circ}\text{C}$ soak. Usually, nested PCRs amplified single ~ 1.5 kb products, in quantities sufficient for sequencing.

Mutations in individual clones were identified using SeqScape v2.5 software (ABI/Invitrogen) and reference *Pig-a* cDNA and genomic DNA sequences.

RESULTS

Genotoxicity of DMBA

The treatment of rats with DMBA resulted in a strong genotoxic response (Table I). The frequency of MN reticulocytes increased ~ 3.5 -fold, as measured shortly after the treatment. Concurrently, the fraction of reticulocytes in DMBA-treated animals decreased 5- to 10-fold (data not shown). Despite such significant hematopoietic toxicity, all treated animals recovered without showing long-term signs of distress. The frequency of CD59-deficient (presumed *Pig-a* mutant) total RBCs increased up to 200-fold in DMBA-treated animals as measured approximately 1 month after the treatment. The frequency of CD48-deficient mutant T-cells increased an average of 10-fold in treated animals (as measured over the period of 1 to ~ 3 months after the treatment).

Sorting and Expansion of CD48-Deficient Phenotypic Mutants

Using 2 mL of spleen cells from untreated rats, after labeling and enrichment for mutants, we were able to sort out an average of <50 CD48-deficient T-cells and fill approximately half of the wells of one 96-WP using the most stringent “single-cell” sorting mode. By comparison,

TABLE I. Frequencies of MN Reticulocytes (MN Rets) and GPI-Anchored Marker-Deficient RBCs and T-cells in Peripheral Blood from DMBA-Treated and Vehicle-Control F344 Male Rats

Animal number	Day 4 frequency of MN Rets (%)	Day 35 frequency of CD59-deficient RBCs (per million)	Frequency of CD48-deficient T-cells (per million) determined on a specific day	
<i>DMBA treated</i>				
1	0.38	215	17	on Day 37
2	0.19	154	62	on Day 46
3	0.17	242	34	on Day 53
4	0.16	270	38	on Day 60
5	0.22	223	50	on Day 78
6	0.15	170	27	on Day 84
Average	0.21 ± 0.09	212 ± 44	38 ± 16	
<i>Vehicle-control</i>				
7	0.05	0	4	on Day 37
8	0.08	0	6	on Day 46
9	0.07	2	0	on Day 53
10	0.06	2	5	on Day 60
11	0.02	1	3	on Day 78
12	0.07	2	3	on Day 84
Average	0.06 ± 0.02	1.2 ± 1	3.5 ± 2	

with similar 2-mL volumes of cells from the rats treated with DMBA, we sorted sufficient T-cells to completely fill three to four 96-WPs with CD48-deficient mutants, with cells remaining. The leftovers were used for additional sorting of up to 600 mutant cells into a single tube for subsequent analysis of mutations as a pool using solid-state sequencing techniques (to be reported elsewhere). Sorting single T-cells into wells containing growth medium often was sufficient for developing a clone. The expansion of cells in individual wells was variable for different animals, but, after 10–13 days of incubation, on average 50% of wells contained multiple cells (presumably clonally expanded). Some clones expanded to about a dozen (or fewer) cells, whereas others expanded to >1,000 cells.

The growth of sorted cells (e.g., the fraction of wells where cell expansion occurred) was similar for cells sorted from both treated and control animals. Only animal #5 (DMBA) and animal #11 (control) exhibited lower than average clonal expansion for the sorted cells (i.e., less than the usual number of wells of 96-WPs contained clones). These two animals were processed together on the same day; coincidentally, on that day, we experienced technical difficulties in sorting owing to instability of the FACSAria side stream.

Clones having <~100 cells were classified as too small for analysis. Harvested and frozen clones containing 100–200 cells (estimated by visual evaluation) were marked as weak; clones containing more than approximately 200 cells were marked as strong (though such a gradation of clones as weak and strong is subjective). For subsequent sequencing, preference was given to analyzing stronger (larger) clones; weak clones were used if the number of strong clones from a particular animal was insufficient.

Although more clones were processed for some animals and fewer for others (Supporting Information Table I), the goal was to sequence 40 or more clones from each DMBA-treated animal and 16 clones from each vehicle-control animal to determine mutation spectra.

Sequencing

We initiated sequencing efforts using a protocol calling for the extraction of mRNA followed by synthesis and analysis of *Pig-a* cDNA [Revollo et al., 2015]. But it was noticed that the mRNA we prepared from the preserved T-cell clones contained significant amounts of genomic DNA, sufficient for a reliable amplification of the *Pig-a* gene. We found that sequencing of *Pig-a* fragments amplified off genomic DNA was more robust than the sequencing of cDNA. It also eliminated an extra step in the overall process (i.e., cDNA synthesis) and simplified handling of the samples (no need to maintain RNase-free environment for some steps). In addition, sequencing genomic DNA was more informative for detecting mutations at splice sites (which turned out to be common) and detecting deletions (deletion of individual exons or the whole *Pig-a* gene). All the mutations listed in Tables II and III and in Supporting Information Table I were determined by the analysis of *Pig-a* genomic DNA (not cDNA).

Tables II and III summarize the mutations determined in clones developed from sorted CD48-deficient T-cells; a complete listing of all mutations for each clone from each animal with resultant amino acid substitutions, alteration in the reading frame, or alternative splicing outcome is provided in Supporting Information Table I. Overall, mutations in the *Pig-a* gene were found in the majority

(~78%) of clones derived from DMBA-treated rats (the other clones contained WT *Pig-a* sequence), whereas the majority (85%) of clones derived from vehicle-control rats had no mutations in the *Pig-a* gene (WT *Pig-a* sequence was identified in these clones). Some *Pig-a* mutations were identified in multiple clones from a single DMBA-treated rat, suggesting in vivo clonal expansion of a single independent mutation. Some mutations were found in several DMBA-treated animals (in two, three, or

four different animals); these were counted as independent mutations and suggest potential hot spots for DMBA mutation. Relatively few total gene deletions were found—only one clone from a control animal and one clone from a DMBA-treated animal failed to amplify all three fragments of genomic DNA. The majority of base-pair substitutions identified in DMBA-treated rats were at A:T basepairs (~64%; 75 out of total 117; Table II), followed by mutations at G:C basepairs (~22%; 26 out of 117; Table II); the most common mutation was A → T (34%), in which the A was on the nontranscribed strand of the *Pig-a* gene (Table III). Every DMBA-treated rat had mutant T-cells in which splice sites of the *Pig-a* gene were altered (always at A:T basepairs), which presumably affected mRNA processing.

Very few independent mutations were identified in vehicle-control animals. These were predominantly frameshifts and complex mutations (with more than one base-pair affected); and these mutations were not common in DMBA-treated animals. There were no mutations at A:T basepairs in vehicle-control rats.

TABLE II. Types of *Pig-a* Gene Mutations Identified in Clones Developed from Single-Cell-Sorted CD48-Deficient Rat T-Lymphocytes from DMBA-Treated and Vehicle-Control F344 Male Rats^a

	From six DMBA-treated rats	From six vehicle-control rats
Total clones analyzed	249	85
Independent mutations ^b	117	13
@ A	73	Not found
@ G	25	1
@ T	2	Not found
@ C	1	1
Frameshifts and complex mutations ^c	15	9
Deletions (partial and total)	1	2
Clones in which mutations were not found	54	72

^aBasepair substitutions, frameshifts, and complex mutations are shown as they appear on the nontranscribed strand of the *Pig-a* gene.

^bThe same mutation found in several clones from a single animal was considered as one independent mutation.

^cFrameshifts include insertion or deletion of one or two nucleotides; complex mutations affect several nucleotides at one site.

DISCUSSION

We studied mutations in the endogenous X-linked *Pig-a* gene of CD48-deficient T-lymphocytes derived from vehicle-control and DMBA-treated rats. Individual CD48-deficient T-cells were sorted using a flow cytometer into culture medium for clonal expansion and subsequent molecular analysis of *Pig-a* mutation. We found that the spectrum of *Pig-a* mutations in CD48-deficient T-cells derived from DMBA-treated rats was different from the spectrum of *Pig-a* mutations in ENU-treated rats—the

TABLE III. Comparison of the Spectra of Independent *Pig-a* Mutations in T-cells of Vehicle-Control, ENU-Treated, and DMBA-Treated F344 Male Rats^a

Mutation	Out of 117 independent mutations from DMBA-treated rats %	Out of 13 independent mutations from vehicle-control rats %	Out of 71 independent mutations from ENU-treated rats ^b %
T→A	<1	0	45
T→C	<1	0	22.5
T→G	0	0	12.7
C→T	<1	7.7	7
C→A	0	0	8.4
C→G	0	0	1.4
G→T	15	7.7	0
G→A	3.4	0	0
G→C	2.5	0	0
A→T	34	0	0
A→G	10	0	0
A→C	18	0	0
Frameshift/complex	13	69	2.8
Deletions	<1	15	NA ^c
Not found (out of total analyzed)	21.6% (54 out of total 249)	85% (72 out of total 85)	11% (13 out of total 118)

^aAll identified sequence alterations are shown for the nontranscribed strand of the *Pig-a* gene.

^bAs reported previously [Revollo et al., 2015].

^cNot applicable; partial or complete deletions cannot be reliably identified by sequencing of cDNA.

former was dominated by A→T transversions, whereas the latter was dominated by T→A transversions [Revollo et al., 2015]. The nature of the basepair substitutions is consistent with the types of DNA damage produced by the two agents (adducts with dA vs. adducts with dT). The spectrum of *Pig-a* mutations in DMBA-treated rats was also very similar to the spectrum of DMBA-induced mutations in the rat *Hprt* gene. Like *Pig-a*, *Hprt* is an X-linked gene, but the *Hprt* mutants were identified not by the absence of cell-surface markers, but by clonal selection with 6-thioguanine [Heflich et al., 1996; Manjanatha et al., 1996, 1998]. Notably, in our studies, the *Pig-a* spectra from ENU- and DMBA-treated rats were both different from the spectrum of spontaneous *Pig-a* mutation in vehicle-treated rats, a spectrum that was dominated by frameshifts. Interestingly, frameshifts are the most frequently found type of *PIG-A* mutation in PNH [Nafa et al., 1998; Mortazavi et al., 2003], which suggests that in humans and rats the mechanisms responsible for spontaneous *Pig-a*/*PIG-A* mutation are similar.

First and foremost, our observations indicate that the flow cytometric assay detecting CD48-deficient T-cells efficiently identifies cells containing de novo mutations in the *Pig-a* gene, at least when the assay is conducted on rats treated with powerful mutagens such as ENU or DMBA. Therefore, it is likely that when the *Pig-a* assay is performed on RBCs from treated rats, the phenotypically mutant RBCs deficient in GPI-anchored surface markers are also derived from cells having de novo *Pig-a* mutations.

Of special interest is the fraction of clones developed from sorted CD48-deficient T-cells that did not carry mutations in the *Pig-a* gene (i.e., that had a WT *Pig-a* sequence; Fig. 3). In ENU- and DMBA-treated animals, this fraction was relatively low (11–21.6%, respectively; Table III and Fig. 3), and thus can be reasonably ascribed to various sources (as mentioned below). In control animals, however, this fraction was fairly large, approximately 85%. Several phenomena may explain such a mismatch between the apparent mutant phenotype and the lack of a detectable mutant genotype. There could be inactivating mutations in genes of the GPI synthesis pathway other than *Pig-a*, or mutations in the *CD48* gene itself. There also could be errors of sorting (sorting of a WT cell instead of a mutant) or a number of clones could have developed from sorted CD48-deficient lymphocytes that had mutations in regions of the *Pig-a* gene that were not sequenced. For instance, mutations in the *Pig-a* promoter region, or in the first exon, would not affect the protein coding sequence, but could affect (repress) *Pig-a* transcription or translation.

Another nonmutually exclusive explanation for the disproportionately high incidence of CD48-deficient T-cells sorted from vehicle-control animals with apparent WT *Pig-a* genotype involves the complexities of T-cell biol-

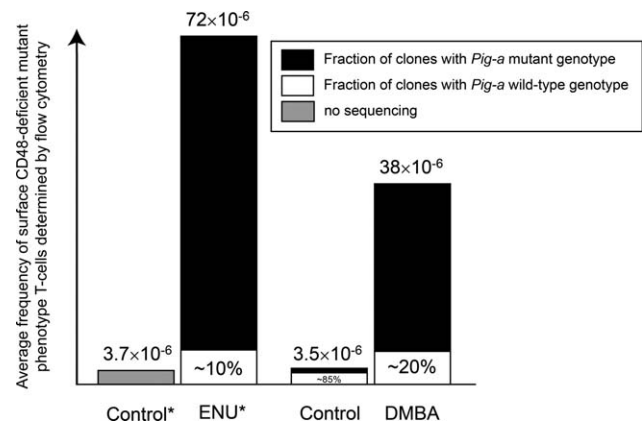


Fig. 3. Expanded clones developed from sorted CD48-deficient mutant phenotype T-cells in which *Pig-a* mutant genotype was confirmed by sequencing. The relative fraction of the mutant genotype clones is superimposed on the averaged absolute frequency of CD48-deficient (presumed *Pig-a* mutant) T-cells determined in vehicle-control and mutagen-treated F344 male rats. An asterisk represents the data that were reported in an earlier study [Revollo et al., 2015]. The frequency of clones with WT *Pig-a* genotype (false mutant clones) is small relative to the frequency of true *Pig-a* mutant clones in ENU- and DMBA-treated rats. Some clones that displayed *Pig-a* WT genotype may have *Pig-a* gene mutations in the regions of genomic DNA that were not covered by the sequencing strategy (e.g., in the first (untranslated) exon of the gene or in regulatory promoter/enhancer elements). The higher relative fraction of clones with WT *Pig-a* sequence derived from vehicle-control animals than from mutagen-treated animals (e.g., ~85 vs. ~20% as in DMBA experiment) suggests that factors other than mutations in the unsequenced regions of genomic DNA may be responsible for the emergence of “false mutant” clones (see discussion in the text).

ogy. It is possible that some T-cells that appear as CD48 deficient at the time of sorting may be quiescent nonmutant WT cells, that is, they may have certain genes (e.g., the *CD48* gene in our case) “silenced” which produces the apparent mutant phenotype. T-lymphocytes are multifunctional cells having an extended lifespan, and they occasionally may be stimulated to divide, secrete cytokines, and reconstitute an assortment of surface proteins, digesting and presenting antigens, and then return to a dormant state until the next stimulation. We hypothesize that the expression of surface-bound GPI-anchored CD48 may be naturally repressed in a small fraction of dormant T-cells. At the time of sorting, such quiescent T-cells may have a characteristic “mutant” phenotype without a mutation in the *Pig-a* gene. Upon sorting and stimulation with mitogens, the dormant T-cells reactivate, divide, and produce clones that are identified as *Pig-a* WT by sequence analysis. After stimulation and expansion, CD48 cell-surface expression in such clones could return to normal, CD48-positive levels. In our previous study of *Pig-a* mutation, we reanalyzed CD48 expression in six clones from one ENU-treated rat [Revollo et al., 2015]. These clones had developed from sorted CD48-deficient “mutant phenotype” cells after 12 days of culture, and in one of these clones the level of CD48 expression was

characteristic of WT T-cells (this particular clone was not analyzed for *Pig-a* mutation).

This reasoning implies that a deficiency in cell-surface CD48 expression may be a normal transient state, at least for a small fraction of WT lymphocytes; and consequently, using CD48 deficiency as a marker of *Pig-a* mutation in T-cells may lead to an overestimation of *Pig-a* mutant frequency. Perhaps incorporating into the assay an additional antibody, against another GPI-anchored surface marker (e.g., CD55), might refine the identification of *Pig-a* mutant cells and eliminate false mutants from consideration. For example, in human granulocyte and reticulocyte *PIG-A* assays, two antibodies against two different GPI-anchored markers were used [Rondelli et al., 2013; Dertinger et al., 2015] (confirmation of *PIG-A* mutation in flow cytometry-identified phenotypically mutant cells was not performed in these studies).

We are not aware of the previous studies suggesting that downregulation of CD48 expression in T-cells is possible; but several reports suggest that GPI synthesis and CD48 surface expression is variable and it increases in activated human lymphocytes [Schubert et al., 1993; Elishmereni and Levi-Schaffer, 2011]. Also, CD48 is absent on quiescent murine hematopoietic stem cells [Chambers et al., 2007; Boles et al., 2011]. A similar reduction in CD48 expression may be observed in at least some quiescent mature T-cells without any involvement of *Pig-a* mutation. CD48 is involved in signaling between an antigen-presenting cell and a T-cell. CD48 may be needed for proper activation of T-cells in mice; nevertheless, the function of CD48 is disposable at the level of the whole animal [Gonzalez-Cabrero et al., 1999].

Thus, we envision a mechanism by which a small fraction of WT T-cells may be falsely identified as *Pig-a* mutants in a flow cytometry assay based on detecting the status of a cell-surface marker. If this mechanism exists for T-cells, the question arises: does it exist for other cell types? We hypothesize that such a mechanism may play a lesser role in cells that have a narrowly defined function and a less complex life cycle, for example, bone marrow cells of erythroid lineage (i.e., colony-forming erythroid cells and progressively differentiated proerythroblasts and nondividing erythroblasts). The only function of proerythroblasts and erythroblasts is accumulating proteins that are essential for the functioning of the final product of differentiation—the RBC. Performing a sorting/sequencing experiment with bone marrow erythroid cells, similar to what we have done here with rat lymphocytes, not only will demonstrate whether GPI-anchored marker-negative “false” *Pig-a* mutants are present in this type of cell, but also will clarify the nature of peripheral blood CD59-deficient reticulocytes and normochromatic RBCs measured in the rat RBC *Pig-a* assay.

Labeling rat erythroblasts and identification of GPI-anchored marker-deficient cells should be possible—a

pilot study has been performed on mouse tissues where an expected spectrum of ENU-induced mutation was confirmed albeit not at the level of individual cells [Kimoto et al., 2011]. Overall, the procedure may be similar to the one currently employed for the reticulocyte *Pig-a* assay that uses GPI-anchored CD59 as a marker of *Pig-a* mutation, perhaps, with minor modifications. Sorting of CD59-deficient mutants also may not be difficult although in vitro clonal expansion of CD59-deficient erythroblasts may be impossible. Colony-forming unit-erythroid cells (and earlier precursors of erythroblasts) might grow in vitro, but it is not clear if these consistently express GPI-anchored CD59 at the surface. In any case, CD59-deficient erythroblasts can be sorted individually into multiwell plates and processed directly for the amplification of the fragments of the *Pig-a* gene. Genetic analysis at the level of a single cell is common for profiling preimplantation embryos in assisted reproduction clinical practices, and multiple protocols have been described earlier [Tsuchiya et al., 2005; Svec et al., 2013]. Our successful two-round amplification of the *Pig-a* exons even from small T-cell clones may be adapted for analyzing mutations in single-cell sorted erythroblasts.

CONCLUSIONS

In conclusion, we have demonstrated that a flow cytometry-based assay detecting T-cells deficient in GPI-anchored markers detects cells having de novo *Pig-a* mutations. By analogy, other assays employing similar methodology for detecting a GPI-anchored surface marker-deficient mutant phenotype (most notably the RBC *Pig-a* assay) should also detect cells resulting from *Pig-a* mutations.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VND—planning, in vivo work, flow cytometry, manuscript preparing; JR—molecular analysis, sequencing; MGP—in vivo work, flow cytometry, sequencing; MMPM—molecular analysis, sequencing; HL—molecular analysis.

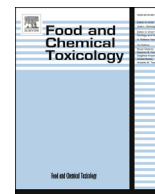
REFERENCES

- Almeida AM, Murakami Y, Layton DM, Hillmen P, Sellick GS, Maeda Y, Richards S, Patterson S, Kotsianidis I, Mollica L, et al. 2006. Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat Med* 12:846–851.
- Almeida A, Layton M, Karadimitris A. 2009. Inherited glycosylphosphatidyl inositol deficiency: A treatable CDG. *Biochim Biophys Acta* 1792:874–880.
- 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.

- Bemis JC, Labash C, Avlasevich SL, Carlson K, Berg A, Torous DK, Barragato M, MacGregor JT, Dertinger SD. 2015. Rat *Pig-a* mutation assay responds to the genotoxic carcinogen ethyl carbamate but not the non-genotoxic carcinogen methyl carbamate. *Mutagenesis* 30:343–348.
- Boles NC, Lin KK, Lukov GL, Bowman TV, Baldrige MT, Goodell MA. 2011. CD48 on hematopoietic progenitors regulates stem cells and suppresses tumor formation. *Blood* 118:80–87.
- Bryce SM, Bemis JC, Dertinger SD. 2008. In vivo mutation assay based on the endogenous *Pig-a* locus. *Environ Mol Mutagen* 49:256–264.
- Chambers SM, Boles NC, Lin KY, Tierney MP, Bowman TV, Bradfute SB, Chen AJ, Merchant AA, Sirin O, Weksberg DC, et al. 2007. Hematopoietic fingerprints: An expression database of stem cells and their progeny. *Cell Stem Cell* 1:578–591.
- Dertinger SD, Phonetepswath S, Weller P, Nicolette J, Murray J, Sonders P, Vohr HW, Shi J, Krsmanovic L, Gleason C, et al. 2011. International *Pig-a* gene mutation assay trial: Evaluation of transferability across 14 laboratories. *Environ Mol Mutagen* 52:690–698.
- Dertinger SD, Avlasevich SL, Bemis JC, Chen Y, MacGregor JT. 2015. Human erythrocyte *PIG-A* assay: An easily monitored index of gene mutation requiring low volume blood samples. *Environ Mol Mutagen* 56:366–377.
- Dobrovolsky VN, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Manjanatha MG, Miura D, Uchikawa M, Mattison DR, Morris SM. 2009. Evaluation of *Macaca mulatta* as a model for genotoxicity studies. *Mutat Res* 673:21–28.
- Dobrovolsky VN, Miura D, Heflich RH, Dertinger SD. 2010a. The in vivo *Pig-a* gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment. *Environ Mol Mutagen* 51:825–835.
- Dobrovolsky VN, Boctor SY, Twaddle NC, Doerge DR, Bishop ME, Manjanatha MG, Kimoto T, Miura D, Heflich RH, Ferguson SA. 2010b. Flow cytometric detection of *Pig-A* mutant red blood cells using an erythroid-specific antibody: Application of the method for evaluating the in vivo genotoxicity of methylphenidate in adolescent rats. *Environ Mol Mutagen* 51:138–145.
- Dobrovolsky VN, Elespuru RK, Bigger CA, Robison TW, Heflich RH. 2011. Monitoring humans for somatic mutation in the endogenous *PIG-a* gene using red blood cells. *Environ Mol Mutagen* 52:784–794.
- Dobrovolsky VN, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Miura D, Heflich RH. 2013. Detection of in vivo mutation in the *Hprt* and *Pig-a* genes of rat lymphocytes. *Methods Mol Biol* 1044:79–95.
- Dobrovolsky VN, Cao X, Bhalli JA, Heflich RH. 2014. Detection of *Pig-a* mutant erythrocytes in the peripheral blood of rats and mice. *Methods Mol Biol* 1105:205–221.
- Elishmereni M, Levi-Schaffer F. 2011. CD48: A co-stimulatory receptor of immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 43:25–28.
- Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Froetschl R, Horibata K, Kenyon MO, Kimoto T, Lovell DP, et al. 2015. The in vivo *Pig-a* assay: A report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup. *Mutat Res* 783:23–35.
- Gonzalez-Cabrero J, Wise CJ, Latchman Y, Freeman GJ, Sharpe AH, Reiser H. 1999. CD48-deficient mice have a pronounced defect in CD4(+) T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1019–1023.
- Hall SE, Rosse WF. 1996. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87:5332–5340.
- Heflich RH, Mittelstaedt RA, Manjanatha MG, Lyn-Cook LE, Aidoo A. 1996. DNA sequence analysis of *hprt* mutations in lymphocytes from Sprague-Dawley rats treated with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Environ Mol Mutagen* 28:5–12.
- Inoue N, Murakami Y, Kinoshita T. 2003. Molecular genetics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 77:107–112.
- Kimoto T, Suzuki K, Kobayashi XM, Dobrovolsky VN, Heflich RH, Miura D, Kasahara Y. 2011. Manifestation of *Pig-a* mutant bone marrow erythrocytes and peripheral blood erythrocytes in mice treated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea: Direct sequencing of *Pig-a* cDNA from bone marrow cells negative for GPI-anchored protein expression. *Mutat Res* 723:36–42.
- Kimoto T, Horibata K, Chikura S, Hashimoto K, Itoh S, Sanada H, Muto S, Uno Y, Yamada M, Honma M. 2013. Interlaboratory trial of the rat *Pig-a* mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody. *Mutat Res* 755:126–134.
- Kinoshita T, Fujita M, Maeda Y. 2008. Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: Recent progress. *J Biochem* 144:287–294.
- Krawitz PM, Murakami Y, Hecht J, Kruger U, Holder SE, Mortier GR, Delle CB, De BE, Thompson MD, Roscioli T, et al. 2012. Mutations in *PIGO*, a member of the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation. *Am J Hum Genet* 91:146–151.
- Krawitz PM, Murakami Y, Riess A, Hietala M, Kruger U, Zhu N, Kinoshita T, Mundlos S, Hecht J, Robinson PN, et al. 2013a. *PGAP2* mutations, affecting the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 92:584–589.
- Krawitz PM, Hochsmann B, Murakami Y, Teubner B, Kruger U, Klopocki E, Neitzel H, Hoellein A, Schneider C, Parkhomchuk D, et al. 2013b. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in *PIGT*. *Blood* 122:1312–1315.
- Manjanatha MG, Lyn-Cook LE, Culp SJ, Beland FA, Heflich RH, Aidoo A. 1996. Lymphocyte mutant frequency in relation to DNA adduct formation in rats treated with tumorigenic doses of the mammary gland carcinogen 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Mutat Res* 357:89–96.
- Manjanatha MG, Shelton SD, Aidoo A, Lyn-Cook LE, Casciano DA. 1998. Comparison of in vivo mutagenesis in the endogenous *Hprt* gene and the *lacI* transgene of Big Blue(R) rats treated with 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Mutat Res* 401:165–178.
- Miura D, Dobrovolsky VN, Kasahara Y, Katsuura Y, Heflich RH. 2008. 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, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Kasahara Y, Heflich RH. 2011. Analysis of mutations in the *Pig-a* gene of spleen T-cells from *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-treated fisher 344 rats. *Environ Mol Mutagen* 52:419–423.
- Mortazavi Y, Merk B, McIntosh J, Marsh JC, Schrezenmeier H, Rutherford TR. 2003. The spectrum of *PIG-A* gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): A high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood* 101:2833–2841.
- Nafa K, Bessler M, Castro-Malaspina H, Jhanwar S, Luzzatto L. 1998. The spectrum of somatic mutations in the *PIG-A* gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria includes large deletions and small duplications. *Blood Cells Mol Dis* 24:370–384.
- Phonetepswath S, Bryce SM, Bemis JC, Dertinger SD. 2008. Erythrocyte-based *Pig-a* gene mutation assay: Demonstration of cross-species potential. *Mutat Res* 657:122–126.
- Revollo J, Pearce MG, Petibone DM, Mittelstaedt RA, Dobrovolsky VN. 2015. Confirmation of *Pig-a* mutation in flow cytometry-identified CD48-deficient T-lymphocytes from F344 rats. *Mutagenesis* 30:315–324.
- Rondelli T, Berardi M, Peruzzi B, Boni L, Caporale R, Dolara P, Notaro R, Luzzatto L. 2013. The frequency of granulocytes with spontaneous somatic mutations: A wide distribution in a normal human population. *PLoS One* 8:e54046.

- Schubert J, Schmidt RE, Medof ME. 1993. Regulation of glycoinositol phospholipid anchor assembly in human lymphocytes. Absent mannosyl transferase activity in affected T and natural killer cell lines from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. *J Biol Chem* 268:6281–6287.
- Svec D, Andersson D, Pekny M, Sjoback R, Kubista M, Stahlberg A. 2013. Direct cell lysis for single-cell gene expression profiling. *Front Oncol* 3:274.
- Torous DK, Phonethpswath S, Avlasevich SL, Mereness J, Bryce SM, Bemis JC, Weller P, Bell S, Gleason C, Custer LL, et al. 2012. In vivo flow cytometric Pig-a and micronucleus assays: Highly sensitive discrimination of the carcinogen/noncarcinogen pair benzo(a)pyrene and pyrene using acute and repeated-dose designs. *Environ Mol Mutagen* 53:420–428.
- Tsuchiya S, Sueoka K, Matsuda N, Tanigaki R, Asada H, Hashiba T, Kato S, Yoshimura Y. 2005. The “spanning protocol”: A new DNA extraction method for efficient single-cell genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 22:407–414.

Accepted by—
S. Dertinger



In vivo genotoxicity assessment of acrylamide and glycidyl methacrylate



Vasily N. Dobrovolsky^{a, *}, M. Monserrat Pacheco-Martinez^b, L. Patrice McDaniel^a,
Mason G. Pearce^a, Wei Ding^a

^a Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR, USA

^b Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2015

Received in revised form

20 November 2015

Accepted 6 December 2015

Available online 11 December 2015

Keywords:

Red blood cells

Reticulocytes

Flow cytometry

Micronucleus test

The *Pig-a* assay

The Comet assay

ABSTRACT

Acrylamide (ACR) and glycidyl methacrylate (GMA) are structurally related compounds used for making polymers with various properties. Both chemicals can be present in food either as a byproduct of processing or a constituent of packaging. We performed a comprehensive evaluation of ACR and GMA genotoxicity in Fisher 344 rats using repeated gavage administrations. Clastogenicity was measured by scoring micronucleated (MN) erythrocytes from peripheral blood, DNA damage in liver, bone marrow and kidneys was measured using the Comet assay, and gene mutation was measured using the red blood cell (RBC) and reticulocyte *Pig-a* assay. A limited histopathology evaluation was performed in order to determine levels of cytotoxicity. Doses of up to 20 mg/kg/day of ACR and up to 250 mg/kg/day of GMA were used. ACR treatment resulted in DNA damage in the liver, but not in the bone marrow. While ACR was not a clastogen, it was a weak (equivocal) mutagen in the cells of bone marrow. GMA caused DNA damage in the cells of bone marrow, liver and kidney, and induced MN reticulocytes and *Pig-a* mutant RBCs in a dose-dependent manner. Collectively, our data suggest that both compounds are in vivo genotoxins, but the genotoxicity of ACR is tissue specific.

Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Acrylamide (ACR), the product of its in vivo metabolism, glycidamide, and glycidyl methacrylate (GMA) are structurally related: they share a vinyl group or a highly reactive oxirane (epoxy) group (Fig. 1), the presence of which triggers genotoxicity alerts (Ashby and Tennant, 1988; Tennant and Ashby, 1991). ACR and GMA are high volume industrial chemicals employed in the manufacture of polymers and polymer coatings, finishes, adhesives, dyes, paper, and in many other applications including treating drinking and waste water. Humans may be exposed to these potential carcinogens at work or as consumers of finished goods. Also, ACR is found in cigarette smoke and in food items as a byproduct of thermal processing (Tareke et al., 2002). GMA is a monomer in a polymerization reaction that produces a thin coating on the internal surface of metal cans intended for food storage/packaging; GMA is classified as a food contact substance by the FDA. GMA is also used in

dentistry as a component of resins and adhesives (Soderholm and Mariotti, 1999). Potentially, a large number of consumers may come into contact with and ingest non-negligible amounts of ACR and GMA on a daily basis, although the degree to which this occurs is unclear.

ACR has been studied extensively since it was identified as a human and animal neurotoxin in the late 1950s (Kuperman, 1958; McCollister et al., 1964; Garland and Patterson, 1967). ACR is a genotoxin and a carcinogen (Mei et al., 2008; Mei et al., 2010; Wang et al., 2010; Von Tungeln et al., 2012; Beland et al., 2013). The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified ACR as a Group 2A compound - a probable human carcinogen, with limited evidence in humans, but sufficient evidence in animals. However, unambiguously demonstrating the in vivo genotoxicity of ACR at (minimally toxic or non-toxic) doses that produce tumors remains an elusive task. In a 2-year rodent bioassay ACR was carcinogenic at doses as low as 1 mg/kg/day in mice and 2 mg/kg/day in rats; while the genotoxicity of ACR was detected at doses of 5 mg/kg/day and greater. GMA toxicity also has been studied extensively, yet the information on its in vivo genotoxic properties and carcinogenic potential remains inconclusive (Organisation for Economic Co-

* Corresponding author. 3900 NCTR Rd., HFT-120, Jefferson, AR 72079, USA.
E-mail address: vasily.dobrovolsky@fda.hhs.gov (V.N. Dobrovolsky).

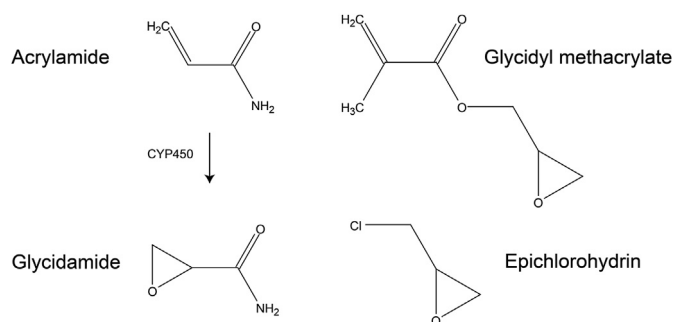


Fig. 1. Chemical structures. Acrylamide is believed to be metabolized into glycidamide by cytochrome P450-containing mixed function cellular oxidases. Glycidamide and glycidyl methacrylate (GMA) have an epoxy (oxirane) group (alternative name of GMA is 2,3-epoxypropyl-acrylic acid ester). The epoxy group is highly strained; it can react with proteins and DNA, and form pro-mutagenic DNA adducts. Epichlorohydrin is an unreacted contaminant in commercial preparations of GMA. GMA is produced by reacting methacrylic acid with epichlorohydrin.

operation and Development (OECD) Screening Information Dataset (SIDS) report; available at <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/106912.pdf>). GMA is not specifically mentioned in IARC publications, although other structurally related compounds, i.e., glycidol, glycidaldehyde, glycidyl stearate and glycidyl oleate (all possessing an epoxy group), are mentioned as Class 2A, 2B and Class 3 compounds.

Here we report the results of a mechanistic study of the *in vivo* genotoxic consequences of exposure to ACR and GMA using standardized models (i.e., the Comet assay and peripheral red blood cell (RBC) and reticulocyte (RET) micronucleus (MN) assay) as well as the novel, highly-sensitive *Pig-a* gene mutation assay. Assays were conducted in F344 rats following OECD Test Guidelines (Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test; Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay) and consensus recommendations from the International Workshop on Genotoxicity Testing (Gollapudi et al., 2015).

2. Materials and methods

Animals, chemicals and treatments. All animal procedures were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the National Center for Toxicological Research.

Solid ACR was of molecular biology gel electrophoresis grade from Bio-Rad (Hercules, CA). A 40% (w/v) stock solution of ACR was made with tissue culture grade water, filter-sterilized and stored at 4 °C. Groups of six 8-week-old Fisher 344 male rats were gavaged with freshly made working stocks of ACR to achieve doses of 0.33, 0.66, 1.32, 2.7, 5, 10, and 20 mg/kg/day continuously for up to 29 days (see Fig. 2).

Liquid GMA was purchased from Aldrich (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO; cat. no.: 151238, 97% pure) and stored at 4 °C. The commercial GMA contained 100 ppm of an inhibitor, monomethyl ether hydroquinone, and 0.02% of epichlorohydrin impurity (Fig. 1). For the *Pig-a*, MN and Comet assays, groups of six male rats were gavaged for up to 29 days with freshly made stocks of 10, 20 and 30 mg/ml GMA in sesame oil to achieve doses of 0, 50, 100 and 150 mg/kg/day (Fig. 2). GMA dosing started at 8.5 weeks of age. In addition, for the short-term Comet assay a separate group of 3 male rats was treated with a dose of 250 mg/kg/day GMA (using a 50 mg/ml stock) for 3 days starting at ~12 weeks of age.

For the Comet assay, an additional 4 to 6 male rats were used as positive controls. These animals were gavaged with freshly prepared 10 mg/ml methyl methanesulfonate (MMS; Sigma–Aldrich)

in PBS 3 h prior to sacrifice. The final dose of MMS was 100 mg/kg.

The first day of the treatment was designated as Day 1. Blood collections for the MN test and the RBC *Pig-a* assay occurred via tail vein on the days shown in Fig. 2.

2.1. The MN assay

The frequency of MN peripheral blood reticulocytes was determined using the Rat MicroFlow kit (Litron Laboratories; Rochester, NY) on Day 4 of the treatment (after 4 administrations of the test articles) and on Day 29 (ACR experiment only). Instructions provided by the kit manufacturer were followed, with the exception that reaction volumes were scaled down 50%. The samples were processed on a FACSCanto II flow cytometer (Becton–Dickinson; Milpitas, CA) and frequencies of MN RETs were calculated as suggested by the manufacturer of the MicroFlow kit. The kit included a scoring control that was used as a positive control.

2.2. The *Pig-a* assay

The *Pig-a* assays were performed before starting treatment and on Days 15, 29, and 56 using the Rat MutaFlow kit (Litron). Blood (~150 µl) for the *Pig-a* assays was drawn from the tail vein using a 1-ml syringe equipped with a 25-Ga needle; immediately, the blood was transferred from the syringe to a 1.5-ml microcentrifuge tube and exactly 100 µl was mixed in another microcentrifuge tube with 100 µl of anticoagulant solution from the kit. Blood labeling, magnetic depletion and analyses were consistent with the suggestions from the manufacturer of the MutaFlow kit. The samples were processed on a FACSCanto II flow cytometer and the *Pig-a* mutant frequencies (MFs) were calculated according to the instructions provided by the kit manufacturer. Mutant-mimic samples (prepared according to manufacturer's instructions), rather than positive control animals, were used as a positive control for the *Pig-a* assay.

2.3. The Comet assay

Rats were euthanized 3 h after the final treatment. Liver and kidney cells were released by mincing the tissues in Ca²⁺, Mg²⁺-free HBSS supplemented with 20 mM EDTA and 10% DMSO (mincing buffer). Then the cell suspension was filtered through a 40-µm cell strainer (Fisher Scientific; Pittsburg, PA) for removing tissue chunks. Bone marrow cells were isolated by flushing femurs with mincing buffer.

The alkaline Comet assay was performed according to the protocol endorsed by the Japanese Committee for the Validation of Alternative Methods (currently OECD Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay). Briefly, single cell suspensions were mixed with 0.5% NuSieve GTG low melting-point (LMP) agarose (Lonza; Rockland, ME) at 37 °C at a 1:10 (v:v) ratio. 100 µl of these mixtures were applied onto glass microscope slides pre-coated with 1% agarose. After solidification of the LMP agarose, the slides were immersed in freshly prepared lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris, adjusted to pH10 and supplemented with 10% DMSO and 1% Triton X-100 just before use) and stored at 4 °C in the dark overnight. The slides then were transferred into a chilled alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). After DNA unwinding for 20 min, electrophoresis was performed in the same solution at 4 °C in the dark for 20 min at 0.7 V/cm. After washing with neutralizing buffer (0.4 M Tris, adjusted to pH 7.5 with HCl) 3 times for 5 min each wash, the slides were fixed in ice cold 100% ethanol and dried overnight.

Prior to scoring, the slides were stained with SYBR Gold (Invitrogen, Carlsbad CA) (1:10,000 dilution in 1 × Tris/Borate/EDTA

Before initiating the main GMA study, a small scale dose range-finding study was performed with doses of 40, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, and 400 mg/kg/day using only 2 animals per dose. The dosing with 200, 250, 300, 350 and 400 mg/kg/day GMA was discontinued after Days 15, 3, 2, 2 and 1, respectively, due to sudden loss of weight or mortality. Doses up to 150 mg/kg/day GMA were tolerated by the animals for 28 days. Animals for which the treatment was discontinued re-gained weight normally.

In the main GMA study, with 6 animals per group, a reduction in weight gain in treated groups was notable – over the 28-Day treatment schedule the high-dose-treated rats gained only half as much weight as the vehicle-control group (Fig. 3).

A dosing error was made on Day 8 of treatment with GMA – three animals from the control group designated for the *Pig-a* assay were accidentally gavaged once with 150 mg/kg of GMA. The accidental treatment with a single dose of GMA did not noticeably affect the three rats as determined by the pattern of weight gain and the subsequent *Pig-a* assays.

In 5 of the 6 rats treated with 150 mg/kg/day GMA for 29 days a gross pathology (mass and nodules) in the forestomach was noted at the time of necropsy and upon microscopic examination described as squamous hyperplasia. A gross “lesion” (having the microscopic correlate of necrosis) was observed in one of three rats treated with 250 mg/kg/day GMA for 3 days. Non-neoplastic squamous hyperplasia was confirmed microscopically in GMA-treated rats with increasing numbers of affected animals and severity in groups treated with the higher GMA doses (e.g., forestomach hyperplasia in 5 out of 6 rats in the 150 mg/kg/day \times 29 group and in 3 out of 3 rats in the 250 mg/kg/day \times 3 group); in addition, forestomach edema was confirmed in 3 out of 3 rats in the 250 mg/kg/day \times 3 group. These observations were consistent with the route of delivery of GMA, gavage. These lesions were not observed in vehicle-control animals.

No gross observations were recorded in the liver or kidney of GMA-treated animals. The kidneys and the livers from GMA-treated animals (gross and microscopic) were consistent with the normal phenotype observed in the vehicle-control group.

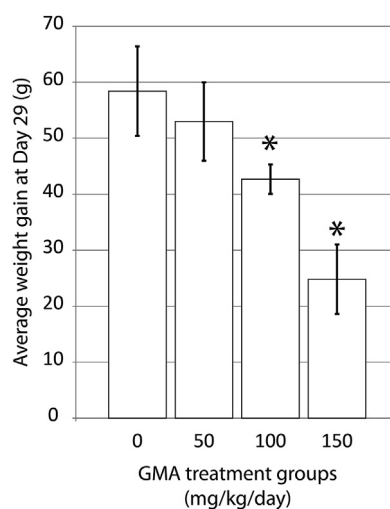


Fig. 3. Weight gain in male Fisher 344 rats gavaged with glycidyl methacrylate (GMA) for 28 days. Rats gavaged with 100 and 150 mg/kg/day gained significantly less weight than the control animals (one way ANOVA; marked with *). Animals designated for the MN/*Pig-a* and the Comet parts of the study were weighed (total of 12 animals for each GMA treatment group). Error bars represent standard deviation.

3.2. Genotoxicity assessments

Clastogenicity/aneugenicity was measured by induction of MN RETs in peripheral blood. ACR was negative with the chosen treatment regimen, both on Day 4 of continuous daily treatments, and on Day 29 (after 28 consecutive treatments) of the study (Fig. 4A).

GMA was positive on Day 4 of the study; the frequency of MN RETs increased in a dose-related manner in treated animals, with the increase in the group treated with 150 mg/kg/day being statistically significant (Fig. 4B).

Mutagenicity was measured by the induction of CD59-deficient *Pig-a* mutant RBCs and RETs in peripheral blood. The only evidence of ACR mutagenicity was observed in rats treated for 28 days with 20 mg/kg/day and assays on Day 56 of the study, i.e., 28 days after the last treatment (Fig. 5A). No collaborating increases in the frequency of CD59-deficient RETs were observed at any time-point (Fig. 5B). One animal in the control group produced unexpectedly high values for RBC and RET *Pig-a* MFs on Day 56. But even if this outlier was excluded from statistical analyses, the overall results remained the same.

On the other hand, evidence for mutagenicity of GMA was observed in the total RBC fraction of rats treated with 50, 100 and 150 mg/kg/day on Days 29 and 56 of the study using repeated-measures statistical assessment (Fig. 5C). In addition, the increase in *Pig-a* mutant total RBCs was corroborated with the increases in the frequency of mutant RETs for the 100 and 150 mg/kg/day doses and at time-points as early as Day 15 (Fig. 5D).

DNA damage was measured using the alkaline Comet assay. The tissues for the Comet assay were chosen based upon previously published data on in vivo genotoxicity for ACR (Rothfuss et al., 2010) and on GMA general toxicity (OECD SIDS report). Analyses of the Comet assay data using median and mean values of percent DNA in tail resulted in similar statistical outcomes.

Dosing with 10 mg/kg/day ACR for 29 consecutive days resulted in DNA damage in the liver (quantified as percent tail DNA; Fig. 6A). Considering the historical background levels of DNA damage in liver cells of untreated animals in our laboratory of 2.7 ± 0.9 (average \pm SD; for 32 animals), such an increase may be regarded as weak. No increase in DNA damage was detected in bone marrow cells from ACR-treated rats.

DNA damage was detected in all tested tissues from animals treated with GMA. DNA damage was increased in bone marrow and liver cells of rats treated with one or more concentrations of GMA for 29 days (Fig. 6B), and in bone marrow, liver and kidney cells of animals treated with a higher dose of GMA, 250 mg/kg/day, but for a shorter period of 3 days (Fig. 6C).

In the Comet assay, the levels of DNA damage in tissues of positive control animals treated with MMS were consistent with historical data established in our lab: 10-fold higher than in vehicle-control animals for cells from liver and bone marrow, and 2-fold higher than in vehicle-control animals for cells from the kidney.

4. Discussion

ACR and GMA are high-volume industrial chemicals that are not used directly at the consumer level. Although known as being hazardous materials, manufacturing of these chemicals is controlled so that only small populations can be accidentally exposed to them (e.g., employees in their work environment). The revitalized concern about these chemicals is that they may be present in food and subsequently may affect much wider populations. ACR was found at concentrations of up to 3.5 mg/kg in thermally treated (fried, grilled or baked) starchy items (Tareke et al., 2002). GMA is

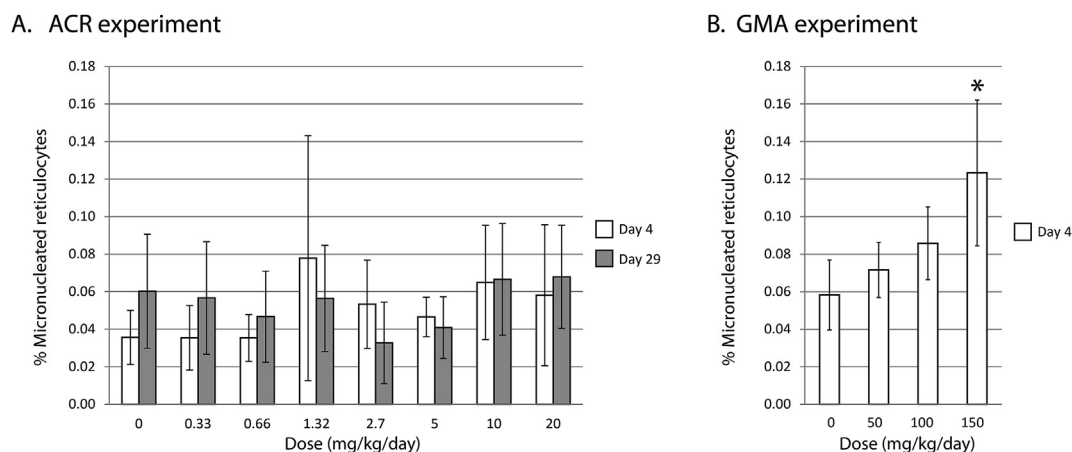


Fig. 4. The frequency of micronucleated (MN) reticulocytes (RETs) in rats treated with acrylamide (ACR) or glycidyl methacrylate (GMA). A. No significant effect of treatment with ACR was observed at Days 4 and 29. B. In rats treated with GMA, a dose-related increase in the frequency of MN RETs was observed on Day 4, with the response in high dose-treated rats vs. control rats being statistically significant (one way ANOVA with Tukey test; shown with *). Error bars represent standard deviation.

used to make polymeric materials that the FDA and EFSA have authorized for use in food packaging, and it is conceivable that the GMA monomer may leach into food from such packaging.

We undertook a mechanistic study for detecting the genotoxicity of ACR and GMA applying standard or recommended tests for nonclinical safety evaluations of drugs intended for human use. The detection of *in vivo* MN RBCs and RETs was used as a test for clastogenicity and aneugenicity. The *Pig-a* assay was used as a test for mutagenicity; and the Comet assay was used as a test for DNA damage. The overall experiment was designed to mimic integration of genotoxicity tests into standard 28-day repeated dose general toxicology evaluations with a dosing range up to maximum tolerated dose (OECD Test No. 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents).

ACR doses for this study were chosen from the available literature on genotoxicity and carcinogenesis (Rothfuss et al., 2010; Beland et al., 2013). GMA doses for the main study were chosen from a preliminary scale dose range-finding experiment. The reported oral acute LD₅₀ dose of GMA is about 600 mg/kg; surprisingly, a dose of 150 mg/kg, which is 25% of the acute LD₅₀, was tolerated by rats for 29 consecutive days. The body of literature on ACR and GMA suggests that both should be weak genotoxins. For this reason the study was organized to maximize the sensitivity of each employed test. The maximum response in the *Pig-a* assay (a test that is capable of detecting the response to cumulative treatment dose) is achieved in the RET fraction about 2 weeks after the last treatment and in the RBC fraction about 8 weeks after the last treatment, yet the response in the Comet and MN assays decreases sharply within days after cessation of the treatment. The Comet assay requires termination of animals, while the MN and *Pig-a* assays require only small amounts of peripheral blood. As such, we employed two cohorts of experimental animals: one for the *Pig-a* and MN assays (in which both assays were performed on the same set of animals, with blood collections on Days -1, 4, 15, 29 and 56), and another for the Comet assay (these animals were terminated for sampling after 3 or 29 daily treatments).

Previously it was shown that doses of 5 mg/kg/day ACR and higher induce robust responses in the Comet assay in a 29-day treatment protocol (Rothfuss et al., 2010). Although we couldn't demonstrate a statistically significant response for the 5 mg/kg/day dose, the 10 mg/kg/day dose produced a 2.8-fold increase in DNA damage, but only in liver cells. It might be relevant that the positive response determined previously using an ACR dose of 5 mg/kg/day

employed a different timing between the last treatment and tissue collection, 2 h (instead of the 3-h interval in our experiment). Such a 1-h difference in timing may affect the measurement of DNA damage in the Comet assay considering the rapid elimination kinetics of ACR in the rat (Rothfuss et al., 2010). It is unlikely that the low levels of inflammation in the liver noted in the histopathological examination affected the outcome of the Comet assay in our experiment - inflammation was present at similar levels in control and treated rats.

The lack of response in the Comet assay in bone marrow cells in our study is consistent with the outcomes of the MN and *Pig-a* assays. Usually, the MN and *Pig-a* assays reflect genotoxic activity in bone marrow - if there is no DNA damage in bone marrow, the chances of forming MN or mutations are low. Overall our observations are in accord with the findings of the collaborative study in which ACR did not increase the frequency of MN RETs at any dose tested (Rothfuss et al., 2010). Also, hematopoietic malignancies are not characteristic of ACR-treated animals. Based on this information, ACR can be characterized, at best, as a weak-to-modest tissue-specific genotoxin and carcinogen in rats.

According to reports, GMA can form DNA adducts (Fang et al., 1999), and it is genotoxic *in vitro* (Canter et al., 1986; von der Hude et al., 1991). In our study, GMA was genotoxic in rats in all the assays that were employed and in all tissues tested (bone marrow, liver and kidney). In the 28-day study, the response to GMA was the most robust and dose-dependent in the liver. Kidney was chosen for examination in our study based on a previous report that absolute and relative kidney weights were increased in animals treated with 100 mg/kg/day GMA for 45 days (OECD SIDS report). We didn't observe kidney weight increases, but we saw a significant increase in DNA damage in kidney cells in the 3-day treatment with a toxic dose of 250 mg/kg/day GMA. The increase in DNA damage in bone marrow was accompanied by an increased frequency of MN RETs in peripheral blood on Day 4 and increases in the frequencies of *Pig-a* mutant RBCs and RETs. While performing the *Pig-a* assay, concurrent increases in the frequencies of mutant RBCs and RETs are important for reliably classifying a positive response (Gollapudi et al., 2015). The most dramatic effect of the treatment with GMA was observed in the forestomach, which is the immediate point of contact. This result is consistent with findings mentioned in the OECD SIDS report. It is possible that DNA damage in the cells of forestomach is even higher than in the liver. Unfortunately, performing the Comet assay on forestomach cells is

ACR experiment

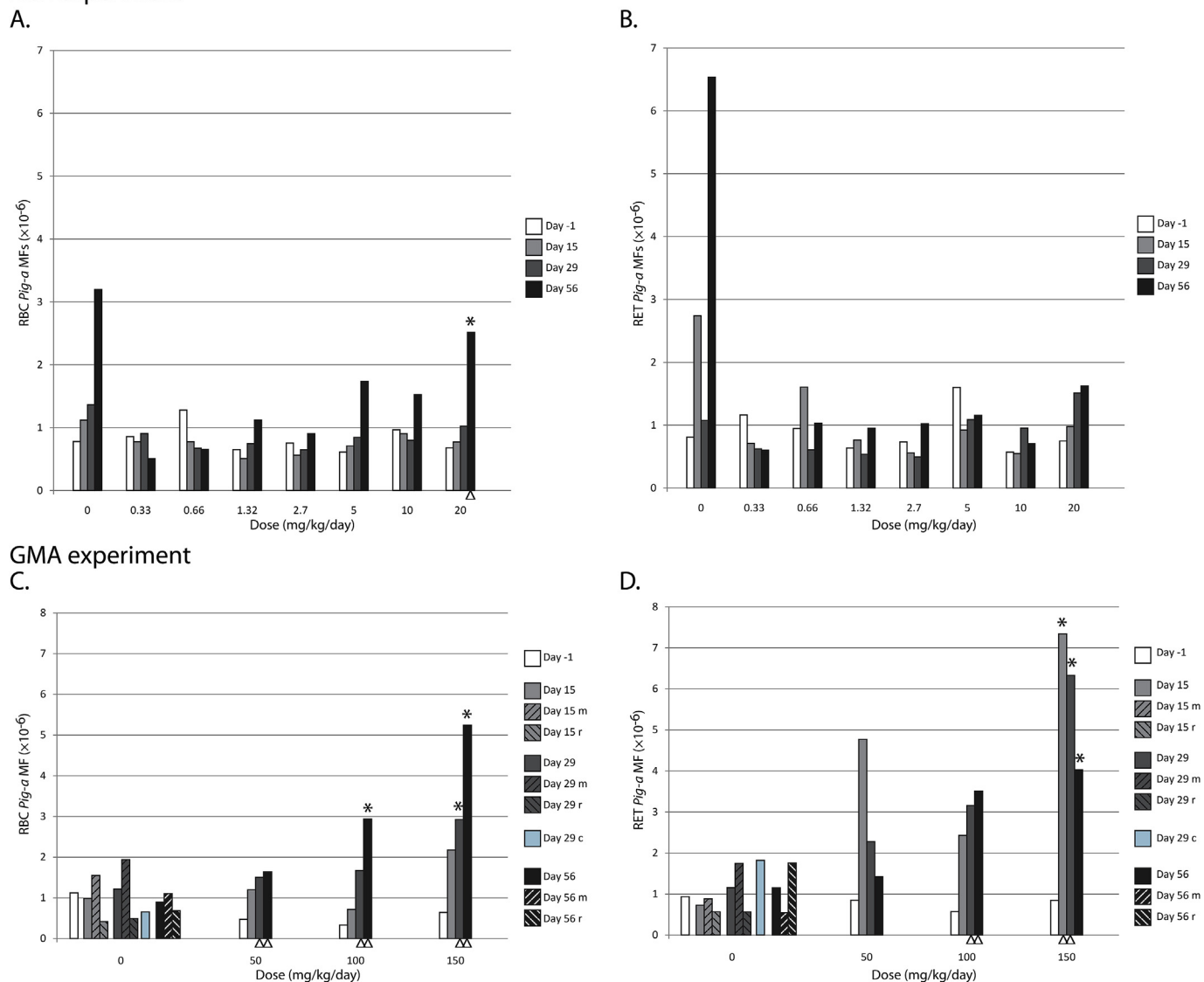


Fig. 5. *Pig-a* data statistical analyses. Average total RBC (A and C) and reticulocyte (RET; B and D) *Pig-a* MFs are shown for animals treated with acrylamide (ACR; A and B) or glycidyl methacrylate (GMA; C and D). Standard deviation error bars are not shown in order to avoid cluttering. Complete *Pig-a* data for each experimental animal at each time-point can be found in [Supplemental Table 1](#). Data related to different time-points are shown by a different color (or a different shade of gray). *Pig-a* MFs for different treatment groups at any specific time-point (before treatment (Day -1) and Days 15, 29 and 56) were compared by one-way ANOVA (e.g., eight groups treated with the range of ACR doses from 0 to 20 mg/kg/day at Day 56). Statistically significant differences between the treatment groups are indicated by * (marked for the group identified in Tukey test). In the ACR experiment, only the Day 56 high dose-treated group (20 mg/kg/day) showed a statistically significant elevated *Pig-a* MF; even then it was different not from the vehicle-control group, but rather from the group treated with the low dose ACR (0.33 mg/kg/day). Responses to treatment were compared for the animals in each treatment group over several time-points (e.g., the 20 mg/kg/day ACR group at Days -1, 15, 29, and 56) using one way Repeated Measures ANOVA. A significantly different response to treatment at a specific time-point (compared to Day -1 data, as determined by Tukey test) is indicated by an open triangle (Δ) under the appropriate bar. The *Pig-a* data for the control animals in the GMA experiment for Days 15, 29 and 56 are shown either as combined (solid light gray, dark gray and black color bars) or separated into two subgroups shown with the left or right hatched color pattern bars representing the three rats mistakenly (m) treated once (on Day 8) with the high dose of GMA and the remaining (r) true vehicle-control rats. The blue bars represent *Pig-a* data determined on Day 29 for the six vehicle-control rats designated for the Comet assay (c); it is shown for comparison purposes only, although it can be used as a vehicle-control group for comparing the response to GMA treatment measured at Day 29. Overall using longitudinal data generated for each treatment group (and each individual animal) for statistical evaluation may provide a more sensitive tool for detecting the effect (the induction of *Pig-a* mutant RBCs and RETs) of treatment with weak mutagens. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this article.)

challenging due to difficulties in processing which may contribute to extremely high backgrounds. Based on our results, GMA can be characterized as a systemic genotoxin and mutagen in rats.

We have used an approach to statistical analysis of data generated with the *Pig-a* assay that is different from the one used so far in *Pig-a* studies. Conventionally, the *Pig-a* MF data determined in treatment and control groups (composed of different subjects) are compared, with separate pair-wise comparisons conducted for data

obtained at each specific sampling time-point (IWGT Workgroup recommendation (Gollapudi et al., 2015)). At the same time, it is a common practice to acquire *Pig-a* data before the initiation of the treatment (e.g., in order to identify and eliminate potential outlier animals before committing to a long-term repeated administration study) and at several time-points after that (while on or after the treatment) in the same animals. Assuming that 1) the antibody/stain labeling and magnetic enrichment protocols are reproducible,

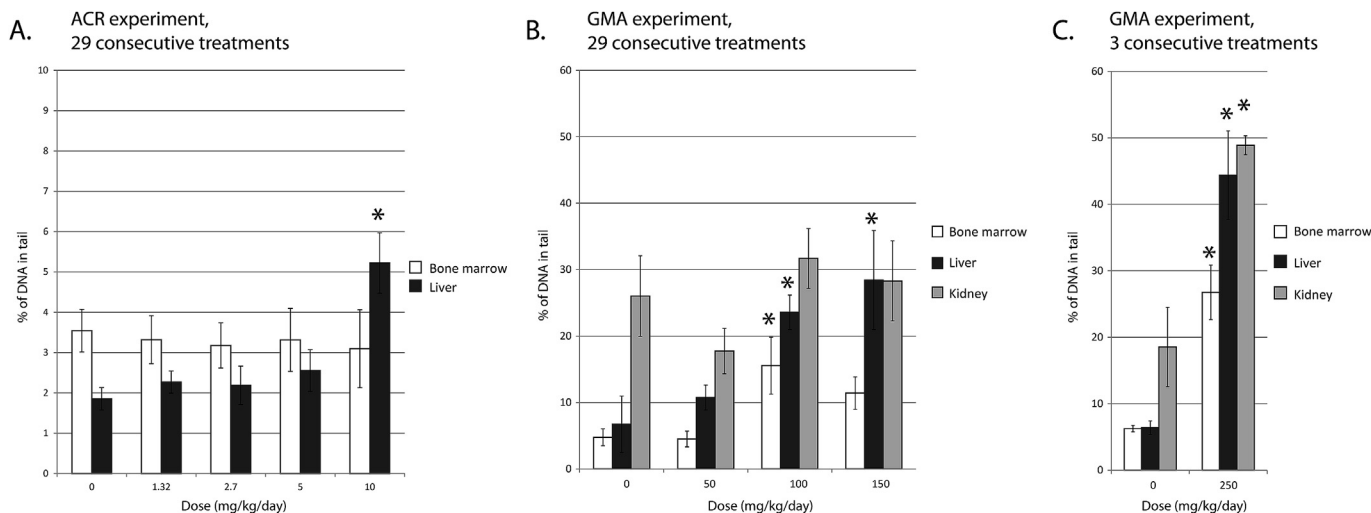


Fig. 6. The Comet assay with tissues from F344 male rats treated repeatedly with acrylamide (ACR) or glycidyl methacrylate (GMA). Data are shown as mean %DNA in tail for samples of bone marrow, liver and kidney cells. Note the difference in scale of vertical axes in the ACR and GMA experiments. A: a weak but statistically significant increase of DNA in tail was noted in the liver of animals treated with 10 mg/kg/day ACR, the highest ACR dose tested in the Comet assay. B: in animals treated with 29 consecutive doses of up to 150 mg/kg/day GMA statistically significant increases of DNA damage were determined for bone marrow cells for a GMA dose of 100 mg/kg/day and liver cells for GMA doses of 100 and 150 mg/kg/day (one way ANOVA followed by Tukey test; marked with *). C: using a truncated treatment schedule and a higher GMA dose of 250 mg/kg/day for 3 days, significant increases in DNA damage were observed in bone marrow, liver and kidney (Student's T-test); the 250 mg/kg/day dose was toxic in the preliminary 28-day dose range-finding study. Error bars represent standard deviation.

2) the flow cytometer used for collecting data has no appreciable drift in measuring fluorescence signal, and 3) the same gating strategy is used for analysis of all samples and at all time-points, the comparisons of *Pig-a* MFs can be determined within the same treatment group before, during and after the treatment. Such comparisons may be more sensitive because the values collected prior to treatment can be used as individual controls for each experimental animal (Glantz, 1992). The mathematical apparatus for such comparisons (e.g., paired T-test or repeated-measures ANOVA) is available in most statistical software packages. Longitudinal analyses may not require a separate vehicle-control group and, theoretically, can be useful (in certain situations) for reducing the total number of experimental animals. In our study, using the “before-during-after” longitudinal approach for analyses of *Pig-a* MF data was essential as an error in dosing of three vehicle-control animals practically invalidated the whole vehicle-control group. Nevertheless, we also performed the standard comparisons of the control and treatment groups as if no error of dosing of the control occurred, as we believe that GMA, being a relatively weak mutagen, may not induce a detectable response after a single administration. Our results suggest that repeated-measures ANOVA can identify statistically significant *Pig-a* responses to GMA treatment earlier and at lower treatment doses than the standard control vs. treatment groups ANOVA.

In conclusion, using a novel combination of genotoxicity assays we have characterized GMA as a systemic in vivo genotoxin. It remains to be determined what risk it may represent to consumers of food that potentially contain trace amounts of GMA, but our results warrant future studies of the potential impact of GMA on human health. Another unanswered question may be to what degree a genotoxic contaminant present in commercial GMA stocks, epichlorohydrin (Rossi et al., 1983), contributed to the effect determined in this study or may contribute to potential genotoxicity in consumer products.

Disclaimer

The views presented in this article do not necessarily reflect

those of the U.S. Food and Drug Administration.

Contributions

VND – study design, in vivo work, flow cytometry/*Pig-a* assay, drafting the manuscript.
 MMPM – flow cytometry.
 LPM – in vivo work.
 MGP – in vivo work, flow cytometry/*Pig-a* assay.
 WD – the Comet assay.

Acknowledgment

The authors would like to thank Dr. Robert H. Heflich for valuable comments on the experimental design, data analysis and interpretation. M.M. Pacheco-Martinez's participation was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; Mexico) and by the Oak Ridge Institute for Science and Education through an interagency agreement between the U.S. Department of Energy and the U.S. FDA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.006>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.006>.

References

- Asby, J., Tennant, R.W., 1988. Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.* 204, 17–115.
- Beland, F.A., Mellick, P.W., Olson, G.R., Mendoza, M.C., Marques, M.M., Doerge, D.R., 2013. Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F(1) mice and F344/N rats from a 2-year drinking water exposure. *Food Chem. Toxicol.* 51, 149–159.
- Canter, D.A., Zeiger, E., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., 1986.

- Comparative mutagenicity of aliphatic epoxides in *Salmonella*. *Mutat. Res.* 172, 105–138.
- Fang, F.D., Lei, H.X., Zuo, J., Tan, M.J., Xu, J.N., 1999. Formation of glycidyl methacrylate-DNA adducts in vivo. *Biomed. Environ. Sci.* 12, 95–102.
- Garland, T.O., Patterson, M.W., 1967. Six cases of acrylamide poisoning. *Br. Med. J.* 4, 134–138.
- Glantz, S.A., 1992. *Primer of Biostatistics*, third ed. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Gollapudi, B.B., Lynch, A.M., Heflich, R.H., Dertinger, S.D., Dobrovolsky, V.N., Froetschl, R., Horibata, K., Kenyon, M.O., Kimoto, T., Lovell, D.P., Stankowski, J., White, P.A., Witt, K.L., Tanir, J.Y., 2015. The in vivo *Pig-a* assay: a report of the International Workshop on genotoxicity testing (IWGT) workgroup. *Mutat. Res.* 783, 23–35.
- Kuperman, A.S., 1958. Effects of acrylamide on the central nervous system of the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 123, 180–192.
- McCollister, D.D., Oyen, F., Rowe, V.K., 1964. Toxicology of acrylamide. *Ther. Ggw* 103, 172–181.
- Mei, N., Hu, J., Churchwell, M.I., Guo, L., Moore, M.M., Doerge, D.R., Chen, T., 2008. Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 628–636.
- Mei, N., McDaniel, L.P., Dobrovolsky, V.N., Guo, X., Shaddock, J.G., Mittelstaedt, R.A., Azuma, M., Shelton, S.D., McGarrity, L.J., Doerge, D.R., Heflich, R.H., 2010. The genotoxicity of acrylamide and glycidamide in big blue rats. *Toxicol. Sci.* 115, 412–421.
- Rossi, A.M., Migliore, L., Lascialfari, D., Sbrana, I., Loprieno, N., Tortoreto, M., Bidoli, F., Pantarotto, C., 1983. Genotoxicity, metabolism and blood kinetics of epichlorohydrin in mice. *Mutat. Res.* 118, 213–226.
- Rothfuss, A., O'Donovan, M., De Boeck, M., Brault, D., Czich, A., Custer, L., Hamada, S., Plappert-Helbig, U., Hayashi, M., Howe, J., Kraynak, A.R., van der Leede, B.J., Nakajima, M., Priestley, C., Thybaud, V., Saigo, K., Sawant, S., Shi, J., Storer, R., Struwe, M., Vock, E., Galloway, S., 2010. Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. *Mutat. Res.* 702, 40–69.
- Soderholm, K.J., Mariotti, A., 1999. BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe? *J. Am. Dent. Assoc.* 130, 201–209.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4998–5006.
- Tennant, R.W., Ashby, J., 1991. Classification according to chemical structure, mutagenicity to *Salmonella* and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutat. Res.* 257, 209–227.
- von der Hude, W., Carstensen, S., Obe, G., 1991. Structure-activity relationships of epoxides: induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 249, 55–70.
- Von Tungeln, L.S., Doerge, D.R., Gamboa da, C.G., Matilde, M.M., Witt, W.M., Koturbash, I., Pogribny, I.P., Beland, F.A., 2012. Tumorigenicity of acrylamide and its metabolite glycidamide in the neonatal mouse bioassay. *Int. J. Cancer* 131, 2008–2015.
- Wang, R.S., McDaniel, L.P., Manjanatha, M.G., Shelton, S.D., Doerge, D.R., Mei, N., 2010. Mutagenicity of acrylamide and glycidamide in the testes of big blue mice. *Toxicol. Sci.* 117, 72–80.

Research Article

Mutation Analysis With Random DNA Identifiers (MARDI) Catalogs *Pig-a* Mutations in Heterogeneous Pools of CD48-Deficient T Cells Derived From DMBA-Treated Rats

Javier R. Revollo,^{1*} Nathaniel M. Crabtree,² Mason G. Pearce,¹
M. Monserrat Pacheco-Martinez,³ and Vasily N. Dobrovolsky¹

¹Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Jefferson, Arkansas

²UALR/UAMS Joint Bioinformatics Program, University of Arkansas at Little Rock, Little Rock, Arkansas

³Departamento De Ciencias De La Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

Identification of mutations induced by xenotoxins is a common task in the field of genetic toxicology. Mutations are often detected by clonally expanding potential mutant cells and genotyping each viable clone by Sanger sequencing. Such a “clone-by-clone” approach requires significant time and effort, and sometimes is even impossible to implement. Alternative techniques for efficient mutation identification would greatly benefit both basic and regulatory genetic toxicology research. Here, we report the development of Mutation Analysis with Random DNA Identifiers (MARDI), a novel high-fidelity Next Generation Sequencing (NGS) approach that circumvents clonal expansion and directly catalogs mutations in pools of mutant cells. MARDI

uses oligonucleotides carrying Random DNA Identifiers (RDIs) to tag progenitor DNA molecules before PCR amplification, enabling clustering of descendant DNA molecules and eliminating NGS- and PCR-induced sequencing artifacts. When applied to the *Pig-a* cDNA analysis of heterogeneous pools of CD48-deficient T cells derived from DMBA-treated rats, MARDI detected nearly all *Pig-a* mutations that were previously identified by conventional clone-by-clone analysis and discovered many additional ones consistent with DMBA exposure: mostly A to T transversions, with the mutated A located on the non-transcribed DNA strand. Environ. Mol. Mutagen. 57:114–124, 2016. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: NGS; flow cytometry; glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor; cell sorting

INTRODUCTION

The genotoxic properties of potentially hazardous compounds can be confirmed by detecting and characterizing mutations induced by such compounds. Mutations are often determined by expanding single, presumably mutant cells into clones. Individual expanded clones are harvested and analyzed by PCR amplification and Sanger sequencing, and the aggregate results generate mutational spectra. While reliable, clone-by-clone analysis is time-consuming at best and not feasible for cells that proliferate poorly. Alternative high-throughput approaches capable of identifying mutations directly from mutant pools, without the need for clonal expansion, would benefit genetic toxicology.

The flow cytometry-based *Pig-a* assay measures gene mutation by detecting cells deficient in GPI-anchored

surface markers. The X-linked *Pig-a* gene encodes an enzyme essential for the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) and the subsequent surface expression of GPI-anchored proteins [Miyata et al., 1993; Nishimura et al., 1999; Luzzatto, 2006]. Since only a single functional copy of *Pig-a* is present in mammals, its

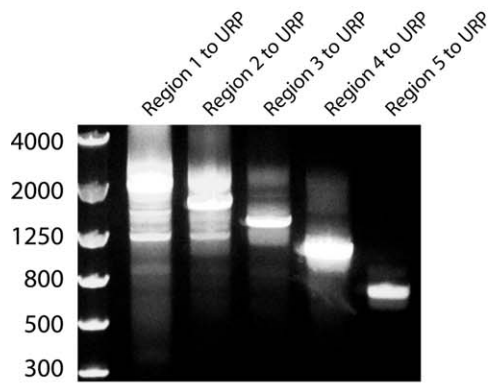
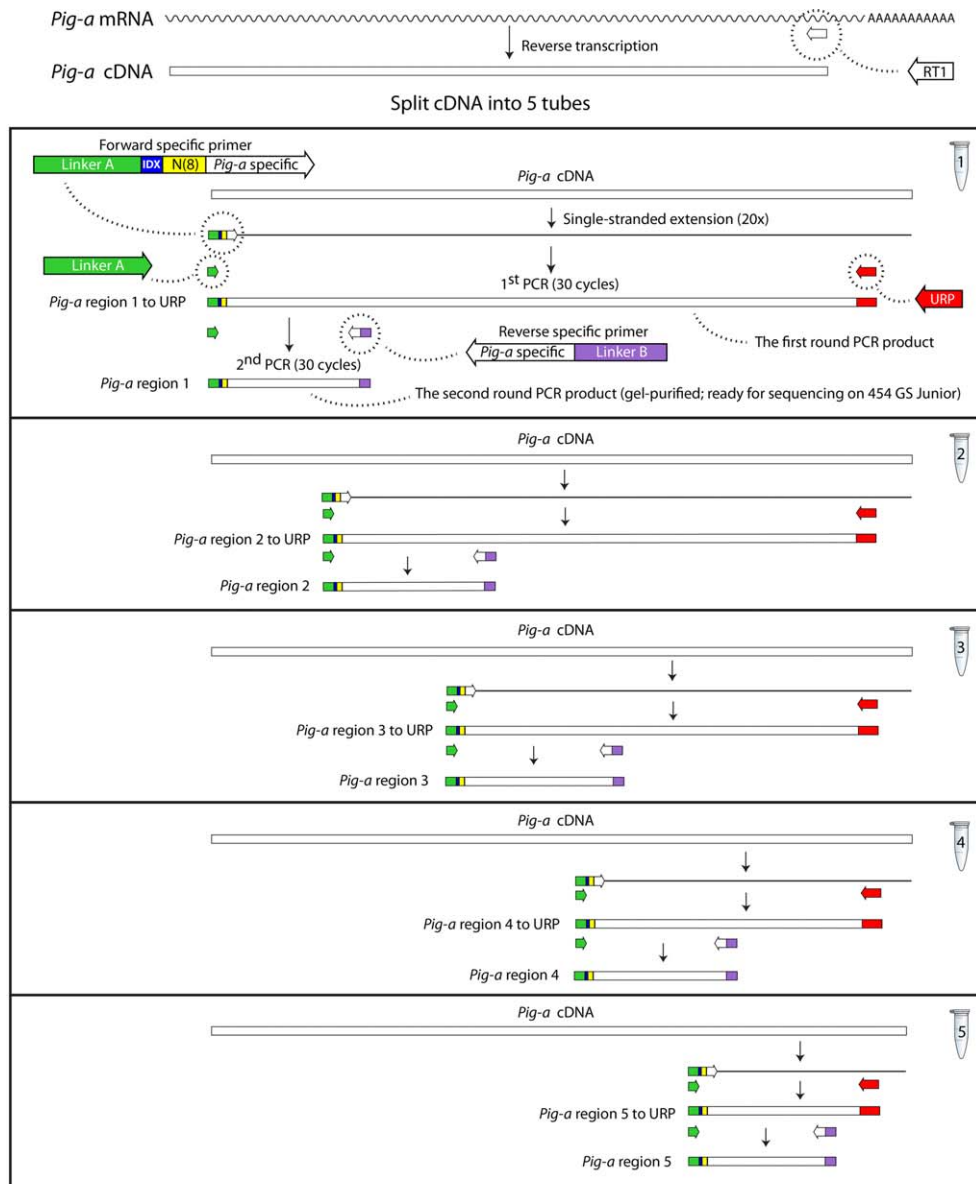
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Javier Revollo, 3900 NCTR Road, HFT-120, Jefferson, AR 72079, USA. E-mail: Javier.revollo@fda.hhs.gov

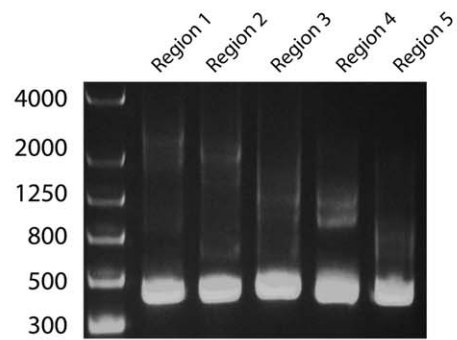
Received 23 July 2015; provisionally accepted 26 November 2015; and in final form 00 Month 2015

DOI 10.1002/em.21992

Published online 18 December 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).



Typical first round PCR products (amplified with Linker A and URP primers)



Typical second round PCR products (amplified with Linker A and reverse specific primers)

Fig. 1.

inactivation should lead to deficiencies in GPI-anchored cell surface markers [Dunn et al., 1996; Keller et al., 1999]. Recently, clone-by-clone analyses of T cells deficient in CD48, a GPI-anchored cell surface marker, from rats treated with the potent mutagens *N*-ethyl-*N*-nitrosurea (ENU) and dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) confirmed that *Pig-a* mutations are largely responsible for this mutant phenotype [Dobrovolsky et al., 2015; Revollo et al., 2015]. However, since only fairly large clones (i.e., composed of more than ~100 cells per clone) were genotyped, the resulting mutational spectra could be biased. More detailed and refined mutational spectra could be produced if all sorted mutant phenotype cells were analyzed without proliferation bias.

Next Generation Sequencing (NGS) systems use massively parallel sequencing to rapidly and affordably analyze DNA molecules. However, despite their immense potential, sequencing error rates of about 1% limit their ability to detect low-frequency mutations [Ross et al., 2013]. Given the rarity of individual mutations in pools of mutant cells, only the few most prevalent mutations can be identified by commonly-used NGS techniques, while other low-frequency mutations are obscured by sequencing errors [Gundry and Vijg, 2012; Revollo et al., 2015]. Fortunately, several techniques have been devised to reduce the NGS error rate, allowing the detection of low-frequency mutations [Schmitt et al., 2012; Lou et al., 2013]. We therefore hypothesized that a similar scheme could be used to directly and efficiently identify individual mutations in large heterogeneous pools of mutant cells.

Here, we describe Mutation Analysis with Random DNA Identifiers (MARDI)—a novel high-fidelity NGS approach that uses oligonucleotides carrying Random DNA Identifiers (RDIs) to tag progenitor DNA molecules before PCR amplification. MARDI enables clustering of descendant DNA molecules and eliminates NGS- and PCR-induced sequencing artifacts. MARDI successfully identified *Pig-a* mutations in large pools of flow cytometry-derived CD48-deficient T cells from DMBA-treated rats and generated a mutational spectrum consistent with DMBA exposure: mostly A to T transversions, with the mutated A located on the non-transcribed DNA strand. Overall, MARDI established that approximately

90% of the cDNA derived from sorted CD48-deficient T cells carry *Pig-a* mutations.

MATERIALS AND METHODS

Flow Cytometry

Rats treated with DMBA in this study were also used in another previously reported study [Dobrovolsky et al., 2015]. Briefly, Fisher 344 male rats were gavaged acutely with DMBA dissolved in sesame oil to achieve a final cumulative dose of 75 mg/kg. The control rat was gavaged with the vehicle only. Approximately 6 weeks later, the spleens were aseptically recovered from the treated animals and white blood cells (WBCs) were released from the spleens. The fraction of mutant phenotype CD48-deficient (presumed *Pig-a* mutants) viable T cells among WBCs was sorted on a FACSAria I cell sorter (BD Biosciences, Milpitas, CA). Labeling, enrichment, and sorting details can be found elsewhere [Dobrovolsky et al., 2015]. Mutant T cells from each animal were bulk-sorted into one tube following the manufacturer's instructions for the most stringent purity sorting mode, single cell sorting. Overall, pools of 350, 600, and 200 CD48⁻ T cells were sorted from DMBA-treated rats #3, #4 and #5, respectively. As a control, 600 CD48⁺ (presumably non-mutant) T cells were sorted from vehicle-treated rat #10.

Nucleic Acid Extraction and cDNA Synthesis

Pools of sorted rat T cells were transferred into 1.5 ml microfuge tubes and pelleted for 5 min at 500g at room temperature. RNeasy Plus Mini kits were used for mRNA extraction following the manufacturer's protocol (Qiagen, Valencia, CA). Pool RNAs were concentrated in 10 μ l of RNase-free water with RNeasy MinElute columns (Qiagen) and stored at -80°C . Pool *Pig-a* cDNA was generated using High Capacity cDNA RT kits (Invitrogen, Waltham, MA) in four individual 20- μ l reactions containing 10 μ l of pool RNA, 1.0 μ M oligonucleotide RT1 (Fig. 1; all oligonucleotide sequences are in Table I), and 20 Units of RNase Inhibitor (Invitrogen) under the following conditions: $48^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ min} + 42^{\circ}\text{C} \times 60 \text{ min} + 4^{\circ}\text{C}$ soak.

RDI Tagging and PCR Amplifications

To tag five regions spanning the entire the *Pig-a* ORF in our four samples, 20 (five regions \times four cDNA samples) independent oligonucleotide extensions were performed using EncycloPCR kits (Evrogen, distributed by Axxora, Farmingdale, NY) in 50 μ l reactions under the following conditions: $95^{\circ}\text{C} \times 90 \text{ s} + (95^{\circ}\text{C} \times 20 \text{ s} + 58^{\circ}\text{C} \times 20 \text{ s} + 72^{\circ}\text{C} \times 2 \text{ min}) \times 20 + 4^{\circ}\text{C}$ soak (Fig. 1). Each reaction contained 4 μ l of a specific pool *Pig-a* cDNA as template and 0.5 μ M of one of twenty "forward-specific" oligonucleotides with the following elements: [Linker A]-[Index]-[N(8)]-[*Pig-a* region] (see Table I). For all five *Pig-a* regions, the index ATG was assigned to the cDNA samples derived from vehicle-treated rat #10, and indexes CTA, GAC, and TCT were assigned to the cDNA samples derived from DMBA-treated rats #3, #4,

Fig. 1. Tagging *Pig-a* ORF regions using *Pig-a* mRNA from pools of sorted T cells. mRNA extracted from sorted T cells was converted to cDNA with *Pig-a* specific RT1 oligonucleotide. The synthesized cDNA was divided into five reactions and tagged by DNA polymerase extensions with "forward-specific" oligonucleotides composed of a 30-base Linker A for 454 sequencing, 3-base indexes (ATG, CTA, GAC, or TCT) for sample identification, 8 random bases for RDI clustering, and five ~20-base *Pig-a* specific sequences for region targeting. The tagged ssDNA molecules were amplified by PCR with oligonucleotides Linker A

and URP, the latter being a common universal reverse primer complementary to the *Pig-a* 3'-untranslated region. The resulting first round PCR products exhibited decreasing sizes. The first round PCR products were re-amplified with Linker A and "reverse-specific" oligonucleotides, the latter being composed of ~20-base *Pig-a* specific sequences for each of five *Pig-a* regions and 30-base Linker B for 454 sequencing. These resulting five products contained ~350 bp inserts covering the entire *Pig-a* ORF flanked by all the necessary elements for unidirectional Roche 454 sequencing (Linker A and Linker B).

and #5, respectively. To amplify the five cDNA-tagged *Pig-a* regions for the four samples, 20 PCRs were performed using EncycloPCR kit reagents under the following conditions: 95°C × 90 s + (95°C × 20 s + 58°C × 20 s + 72°C × 2 min) × 30 + 4°C soak (Fig. 1). Each reaction contained 5 µl of appropriate tagged and extended cDNA as template, 0.25 µM of oligonucleotide Linker A, and 0.25 µM of oligonucleotide URP, in a final volume of 50 µl. To generate 20 sequencing amplicons, 2 µl of 1:100 water-diluted pre-amplified tagged cDNA was amplified with 0.25 µM of oligonucleotide Linker A and 0.25 µM of one of five “reverse-specific” [*Pig-a* region]-[Linker B] oligonucleotides (see Table I) in a final volume of 20 µl using reagents from the EncycloPCR kit and under the following conditions: 95°C × 90 s + (95°C × 20 s + 58°C × 20 s + 72°C × 2 min) × 30 + 4°C soak

TABLE I. Structure and Sequence Composition of 20 Forward-Specific (Four Indexes × Five Regions) and Five Reverse-Specific (Five Regions) Oligonucleotides (See Fig. 1)

Forward-specific oligonucleotides have the following structure:

[Linker A]-[Index]-[N(8)]-[<i>Pig-a</i> region]	
Linker A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
Index	ATG, CTA, GAC, TCT
N(8)	NNNNNNNN
Region 1	GCTCTGAGAACTGATGCGTG
Region 2	TGCCTCTGAGAGTCATGTACA
Region 3	ACAAGCTTCTTACTGTGTCTCT
Region 4	GAGAGATACCAGCTGCACGA
Region 5	TGCTCCAGAAAATATCCACAATG

Reverse-specific oligonucleotides have the following structure: [Linker B]-[*Pig-a* region]

Linker B	CCTATCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG
Region 1	TGAAAGAGAGTCGTGGCTGT
Region 2	AGGATCTACAGCGTTAGGAATGA
Region 3	AAGCTCCAAAAGTTGCACC
Region 4	GTTCTCTCTGCCACATTCCG
Region 5	GGACTTGTTAATTTGGGCTTGC

Other oligonucleotides

RT1	AAGACCCAGAAACATTTG
Linker A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCT
URP	ACATTTGGCCTTTCAGCACC

The 20 forward-specific primers contained one of four three-base indexes, eight-base random sequences for clustering, and one of five ~20-base *Pig-a* region-specific sequences to cover the entire *Pig-a* ORF. The reverse-specific primers only contained one of five ~20-base *Pig-a* region-specific sequences. Linkers A and B are necessary for Roche 454 unidirectional sequencing but can be modified to perform MARDI on Illumina platforms

TABLE II. The 3,738 RDI Groups Separated by Their Sample Index and *Pig-a* ORF Region

	CD48 ⁺ T cells from vehicle-treated rat #10	CD48 ⁻ T cells from DMBA-treated rat #3	CD48 ⁻ T cells from DMBA-treated rat #4	CD48 ⁻ T cells from DMBA-treated rat #5
Index	ATG	CTA	GAC	TCT
No. cells	600	350	600	200
Region 1 (1–295)	371	169	260	114
Region 2 (296–524)	239	125	233	74
Region 3 (525–848)	249	117	258	100
Region 4 (849–1,141)	296	82	258	92
Region 5 (1,142–1,458)	268	116	202	115
Total	1,423	609	1,211	495

Each RDI group is composed of two or more reads that share an identical RDI and fully cover a *Pig-a* ORF region.

(Fig. 1). Linker A and B sequences can be modified to perform MARDI on Illumina platforms.

454 Library Preparation and NGS

The 20 tagged amplicons containing all the necessary sequences for Roche 454 unidirectional sequencing were analyzed on 1.2% agarose gels. The corresponding ~425 bp bands were cut out from the gel and purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Purified amplicons were OD260/280-quantitated, combined in a single tube in an equal ratio, and diluted to create a 10 ng/µl solution of pooled *Pig-a* amplicons. Library preparation was performed according to 454 GS Junior protocol for Lib-L unidirectional sequencing (Roche, Branford, CT). Briefly, 2 µl containing 1 × 10⁷ molecules of water-diluted *Pig-a* amplicons were used as template in an emulsion PCR with beads and reagents provided in the Lib-L kit (emPCR Amplification Method Manual Lib-L for GS Junior). The resulting beads were washed, screened for DNA-coating, combined with the provided sequencing primer, and loaded onto a GS Junior instrument with all the necessary sequencing reagents.

Data Filtering

FASTA files containing a total of 78,485 reads (Supporting Information) were uploaded to the open source, web-based NGS analysis platform Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) and converted to tabular format. Since some reads ended prematurely, the “Select” function was applied to keep only the reads that contained complete coverage of a *Pig-a* target region. Selection patterns used for each region correspond to the last five bases of the forward primer used to amplify that region, the first five bases of the forward primer used to amplify the next region (or in the case of the last region, the first five bases immediately after the Stop codon), and the number of bases separating these five-base patterns, plus or minus five bases. Galaxy selection patterns: (GCGTG).{281,291}(TGCCT) for Region 1, (GTACA).{202,212}(ACAAG) for Region 2, (TCTCT).{299,309}(GAGAG) for Region 3, (CACGA).{265,275}(TGCTC) for Region 4, (CAATG).{312,322}(AAGCA) for Region 5. The resulting 67,012 qualified reads represented the Complete Tabular (CT) list, which contained unique read identifiers for each sequence and complete sequences of *Pig-a* regions.

Data Analysis

To better explain our data analysis using Galaxy, we provide Supporting Information demonstrating each processing step using a few actual reads in FASTA format. The Filtered Tabular (FT) list was generated from the CT list by removing unique read identifiers (assigned by the GS Junior instrument for each read) and replacing them with the first 15 bases of their respective read, or RDI. Each RDI contained a three-

TABLE III. Mutations Detected by MARDI, Sorted by Their Sample Index and Descending Detection Frequencies

Sample index	MARDI percent frequency	Clone-by-clone percent frequency	DNA position	Base change	Codon position	Amino acid change	Mutated RDIs	RDIs covering region
CTA	14.4	7.1	346	A>G	116	I>V	18	125
	8.8	5.4	382	C>T	128	H>Y	11	125
	8.3	5.4	184	G>T	62	E>Stop	14	169
	5.9	5.4	194	A>C	65	H>P	10	169
	4.9	1.8	1,046	G>T	349	C>F	4	82
	3.2	1.8	473	G>A	158	G>E	4	125
	2.6	1.8	1,174	G>C	392	A>P	3	116
	2.6	1.8	1,234	A>T	412	K>Stop	3	116
	2.6	1.8	701	G>T	234	R>I	3	117
	2.4	Not found	925	A>C	309	T>P	2	82
	2.4	1.8	934	A>C	312	T>P	2	82
	2.4	1.8	874	G>T	292	E>Stop	2	82
	2.4	1.8	889	A>T	297	R>Stop	2	82
	2.4	1.8	983	A>T	328	Q>L	2	82
	2.4	1.8	984	G>T	328	Q>H	2	82
	2.4	1.8	403	G>C	135	A>P	3	125
	1.8	1.8	133	InsT	45	Frameshift	3	169
	1.7	1.8	712	A>T	238	R>Stop	2	117
	1.7	1.8	797	G>A	266	G>E	2	117
	1.7	1.8	613	G>T	205	V>F	2	117
	1.6	1.8	407	A>T	136	H>L	2	125
	1.6	1.8	461	A>G	154	H>R	2	125
	1.2	1.8	1,102	A>T	368	K>Stop	1	82
	1.2	1.8	850	A>T	284	R>W	1	82
	1.2	Not found	1,084	A>T	362	K>Stop	1	82
	1.2	1.8	991	A>C	331	S>R	1	82
	0.9	Not found	1,282	A>T	428	I>F	1	116
	0.9	Not found	539	A>T	180	H>L	1	117
	0.9	1.8	583	A>T	195	R>Stop	1	117
	0.9	Not found	685	G>T	229	V>F	1	117
	0.9	Not found	739	A>T	247	I>L	1	117
	0.9	1.8	688	G>T	230	V>F	1	117
	0.6	Not found	119	A>T	40	D>V	1	169
0.6	Not found	196	A>T	66	K>Stop	1	169	
Not found	1.8	680	Complex		Multiple			
Not found	1.8	934	Complex		Multiple			
Not found	8.9	Intron 2	A>T		Splice site			
Not found	1.8	Intron 4	A>T		Splice site			
Not found	3.6	Intron 5	A>T		Splice site			
	91.6	80.4	Total percent frequency					
GAC	44.2	39.6	105	A>G	35	I>M	115	260
	5.0	2.1	184	G>T	62	E>Stop	13	260
	3.9	2.1	427	A>T	143	K>Stop	9	233
	3.4	2.1	346	A>G	116	I>V	8	233
	3.1	2.1	700	A>T	234	R>Stop	8	258
	3.1	2.1	850	A>T	284	R>W	8	258
	2.7	2.1	717	A>T	239	K>N	7	258
	2.3	2.1	583	A>T	195	R>Stop	6	258
	2.3	2.1	712	A>T	238	R>Stop	6	258
	2.3	2.1	164	A>C	55	Q>P	6	260
	2.0	Not found	1,259	A>C	420	H>P	4	202
	1.9	2.1	934	A>C	312	T>P	5	258
	1.7	2.1	407	A>G	136	H>R	4	233
	1.6	2.1	991	A>C	331	S>R	4	258
	1.6	2.1	1,046	G>T	349	C>F	4	258
1.5	2.1	1,147	A>T	383	K>Stop	3	202	
0.9	Not found	428	A>T	143	K>M	2	233	

TABLE III. (continued).

Sample index	MARDI percent frequency	Clone-by-clone percent frequency	DNA position	Base change	Codon position	Amino acid change	Mutated RDIs	RDIs covering region	
	0.4	Not found	514	A>C	172	T>P	1	233	
	0.4	Not found	758	A>T	253	Q>L	1	258	
	0.4	Not found	791	G>A	264	G>E	1	258	
	0.4	Not found	793	G>T	265	E>Stop	1	258	
	0.4	Not found	1,108	G>T	370	G>W	1	258	
	0.4	Not found	821	A>T	274	E>V	1	258	
	0.4	Not found	142	G>T	48	G>C	1	260	
	0.4	Not found	233	A>T	78	K>M	1	260	
	Not found	2.1	Intron 2	A>C		Splice site			
	Not found	2.1	Intron 4	G>A		Splice site			
	Not found	2.1	3'UTR	InsA		PolyA site			
	86.6	75.0	Total percent frequency						
TCT	17.0	17.6	712	A>T	238	R>Stop	17	100	
	11.4	5.9	155	A>G	52	H>R	13	114	
	9.6	5.9	105	A>G	35	I>M	11	114	
	9.0	5.9	702	A>T	234	R>S	9	100	
	8.7	11.8	1,111	DelA	371	Frameshift	8	92	
	6.8	Not found	385	A>T	129	S>C	5	74	
	6.0	5.9	559	A>T	187	T>S	6	100	
	4.1	Not found	472	G>T	158	G>Stop	3	74	
	3.3	Not found	857	A>C	286	Q>P	3	92	
	2.7	Not found	467	InsT	156	Frameshift	2	74	
	2.0	Not found	653	A>C	218	E>A	2	100	
	1.1	Not found	1,111	A>G	370	S>A	1	92	
	1.0	Not found	572	A>T	191	N>I	1	100	
	1.0	Not found	818	A>G	273	E>G	1	100	
	0.9	Not found	3	G>C	1	M>I	1	114	
	0.9	Not found	151	A>T	51	S>C	1	114	
	0.9	Not found	155	A>C	52	H>P	1	114	
	0.9	Not found	1,288	G>T	430	A>S	1	115	
	Not found	5.9	Intron 2	A>T		Splice site			
	Not found	5.9	Intron 5	G>T		Splice site			
	87.1	64.7	Total percent frequency						

Clone-by-clone results for the corresponding mutations are also included.

base sample index, an eight-base random sequence, and the first four bases of each of the five *Pig-a* regions (sufficient information for clustering, de-indexing, and *Pig-a* region identification). The CT list was populated with 67,012 sequences containing 7,893 RDIs. The 3,738 RDIs counted more than once were retained in the RDI list. The RDI list was exported to a local PC workstation, sorted in MS Excel by the three-base sample index and *Pig-a* region identifier, and used to generate Table II, which shows the coverage of *Pig-a* regions for each sample index.

To find mutations, the FT list containing the complete reads with their respective 15-base RDIs was converted to FASTA format and compared against the rat *Pig-a* ORF with the pairwise sequence aligner LastZ (in Galaxy) using the “Roche-454 90% identity” mapping mode and the “Polymorphisms” output format options. For each deviation from the reference sequence, Lastz generates a list cataloguing the anomaly (location and base change relative to the *Pig-a* ORF reference sequence, where A of the ATG “Start” methionine codon is position 1) with the corresponding read identifier (RDI in our case). For instance, if a read contains three deviations from the reference, Lastz generated three records. However, if no deviations are found, Lastz produces no record. To this Lastz-generated Anomalies list, the “Count” function (in Galaxy) was applied to determine recurring anomalies associated with each RDI. The resulting Count of Anomalies list was merged with the

RDI list by the 15-base RDIs using the “Join 2 Datasets” function of Galaxy to produce the Joint list, which contained all the anomalies with their respective count, 15-base RDI, and read count. The “Filter” function in Galaxy was applied to include only anomalies with an anomaly-to-read count ratio >0.9. This last arbitrary filtering step insured that only anomalies strongly associated (i.e., >90%) with a given RDI, and only from RDIs linked to multiple reads, were considered *bona fide* mutations; all other anomalies, like those encountered only once or not encountered frequently enough, were eliminated and regarded as artifacts. Anomalies that mapped beyond their corresponding *Pig-a* region, like in oligonucleotide sequences, were also excluded from analysis. Mutations associated with different RDIs are counted and listed in Table III. Percent frequencies for each mutation are the ratio of the total number of RDIs associated with this specific mutation (Mutant RDIs) to the total number of RDIs covering the region for each sample index (see Table II).

Clone-by-Clone Sanger Sequencing Data

The complete clone-by-clone Sanger sequencing data for *Pig-a* mutations in animals #3, #4, and #5 is available in Supporting Information Table I in Dobrovolsky et al. [2015]. Percent frequencies were

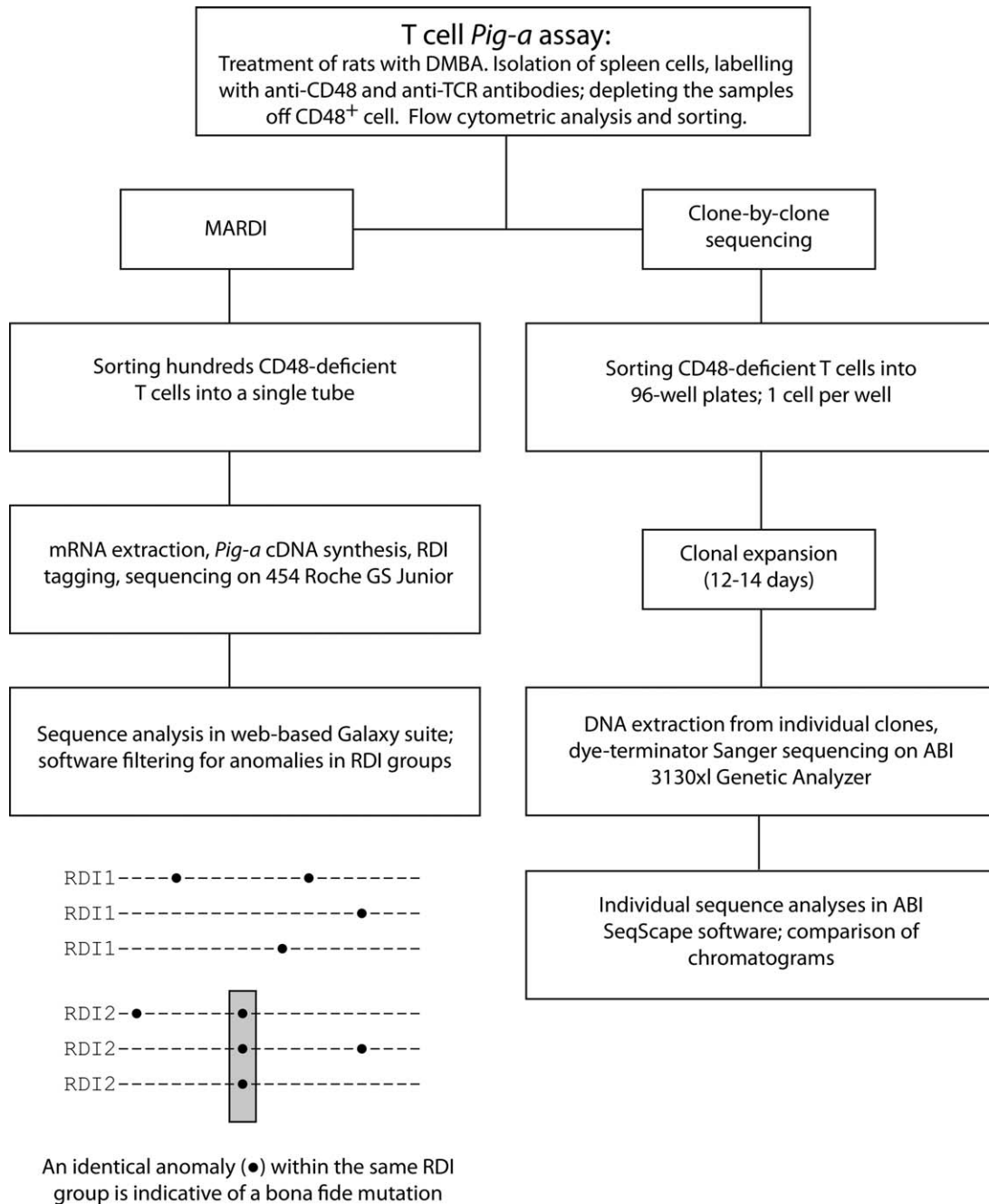


Fig. 2. MARDI (left) versus clone-by-clone analysis (right). After labelling rat spleen T cells with PE-anti-CD48, APC-anti-TCR $\alpha\beta$, and 7-AAD, and depleting CD48⁺ cells with anti-PE beads, both methods isolate rat CD48-deficient T cells by flow cytometry. In the clone-by-clone analysis, single CD48-deficient T cells are isolated, expanded to multi-cellular clones, and each clone is genotyped by genomic DNA PCR, Sanger

sequencing, and base-to-base sequence comparisons. In MARDI, pools of CD48-deficient T cells are isolated, and the whole pool mRNA/cDNA is used to detect *Pig-a* mutations. Bioinformatics analysis identifies mutations by associating Random DNA Identifiers (RDIs) with recurrent sequence anomalies in a given RDI group. False-positives are excluded by failing to meet the anomaly-RDI association criteria.

calculated by dividing the count of clones carrying the same mutation by the total count of clones analyzed within the same animal.

Mutational Spectra

Mutational spectra were derived by dividing the counts of the same types of base changes by the aggregate of counts of base changes, irrespective of their ORF positions and detection frequencies.

RESULTS

Figure 2 compares the steps involved in the clone-by-clone and MARDI strategies. For clone-by-clone mutation analysis, we seeded single CD48⁻ T cells derived from three DMBA-treated rats into 96-well plates. After 12 to 14 days, viable clones were harvested and genotyped for

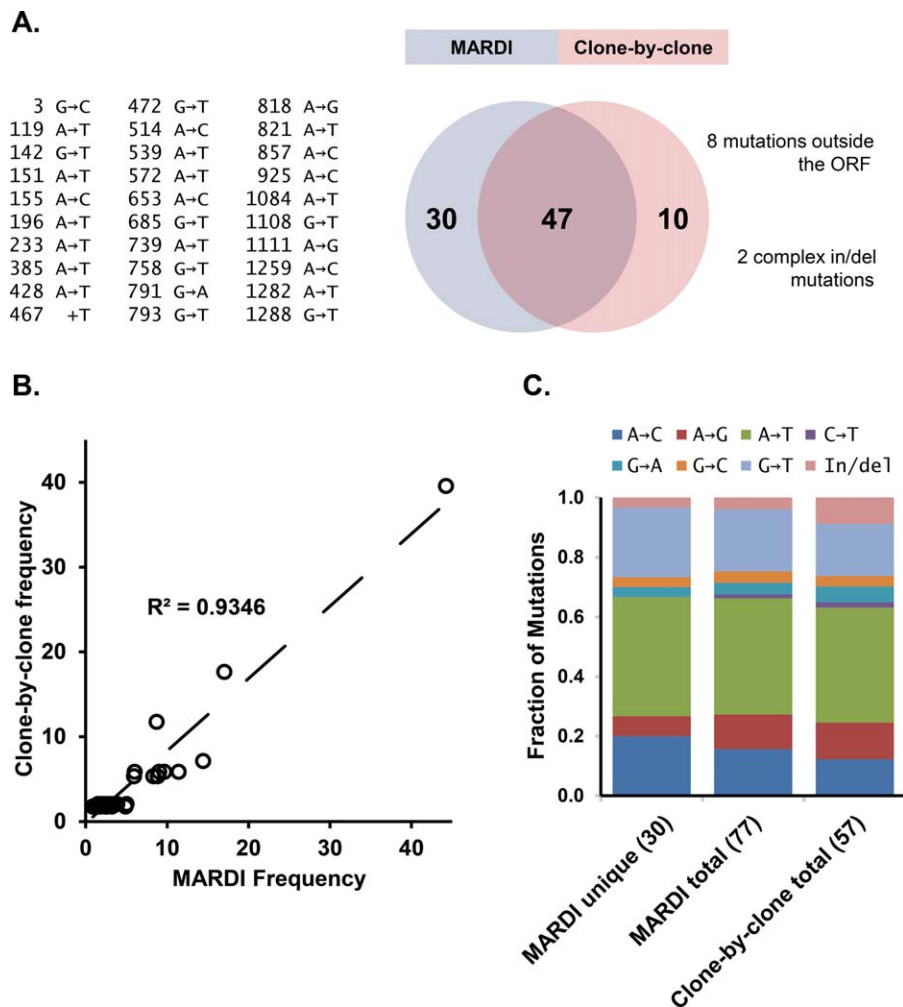


Fig. 3. Mutations identified using MARDI and clone-by-clone analysis. **A)** Venn diagram showing common (47) and unique mutations found using MARDI (30) and clone-by-clone analysis (10), as well a list indicating the unique mutations' *Pig-a* ORF location and type. **B)** An XY-plot illustrating the strong correlation of detection frequencies for the 47

MARDI and clone-by-clone common mutations extracted from Table III. **C)** The mutational spectra found for MARDI unique mutations (30), MARDI total mutations (77), and clone-by-clone total mutations (57) are similar to one another.

Pig-a mutations using their genomic DNA [Dobrovolsky et al., 2015]. For MARDI, we isolated pools containing 350, 600, and 200 CD48⁻ T cells from the same rats. As a non-mutant control, we also isolated a pool containing 600 CD48⁺ T cells from a vehicle-treated rat. From each pool of sorted cells, mRNA was extracted and *Pig-a* cDNA generated. The resulting pool cDNA mixtures were divided into five fractions and tagged with oligonucleotides containing Linker A sequences (for Roche 454 NGS), three known bases for indexing of individual samples (four animal samples in our case), eight random bases for clustering, and ~20 *Pig-a* bases complimentary to one of five *Pig-a* ORF regions (Fig. 1). We performed 20 tagging reactions to cover the entire *Pig-a* ORF in five regions (four indexes × five *Pig-a* regions). Semi-nested PCRs expanded these molecules and created *Pig-a* ORF

regions containing Linker B sequences at their other end (also needed for Roche 454 NGS).

Roche 454 Jr sequencing generated 67,012 reads that completely covered the intended *Pig-a* regions. To establish RDIs, we extracted the first 15 bases from each read—three index bases, eight random bases, and the first four bases of each *Pig-a* ORF region—for de-indexing, clustering, and *Pig-a* region identification, respectively. We detected 7,893 different 15-base RDIs and, out of these, 3,738 RDIs were present more than once. Table II separates these 3,738 RDIs by their sample index and *Pig-a* ORF region.

To find mutations, we assigned the 67,012 reads their corresponding 15-base RDIs and compared them to the rat *Pig-a* ORF with the Lastz sequence aligner. About 100,000 anomalies were detected, embodying the false-

positive issues created by NGS errors. We counted the anomalies and merged that list by the 15-base RDIs with the list containing the read count for the 3,738 15-base RDIs present more than once. Since our approach should have linked a mutation on a progenitor *Pig-a* cDNA molecule with a unique RDI, we reasoned that *bona fide* mutations would be strongly associated with specific RDIs, while NGS and PCR artifacts would occur much less frequently. Therefore, we filtered for RDIs containing anomalies with a >90% anomaly-to-read count ratio.

Table III lists the 77 mutations that had a >90% incidence in individual RDIs present in multiple reads, along with their corresponding sample indexes, amino acid changes, and MARDI and clone-by-clone detection frequencies. No mutations were found in the sample derived from the 600 CD48⁺ T cells from the vehicle-treated rat (ATG index). In contrast, 34, 25, and 18 mutations were detected in the samples of 350, 600, and 200 CD48⁻ T cells from DMBA-treated rats, respectively (CTA, GAC, and TCT indexes, respectively). No RDI was associated with more than one mutation.

Comparing the mutations found by MARDI and clone-by-clone methods and their animal of origin, we found that 47 of them overlapped, and that the detection frequencies for these overlapping mutations strongly correlated (Figs. 3A and 3B). By contrast, 30 and 10 mutations were exclusively found in MARDI and clone-by-clone analysis, respectively (Fig. 3A). None of the 30 mutations unique to the MARDI approach were silent, and most exhibited detection frequencies lower than 1% (Table III). The 10 clone-by-clone unique mutations were either outside of the *Pig-a* ORF or multi-base insertions/deletions (Fig. 3A), underscoring the significance of non-coding DNA mutations.

Despite their own unique mutations, the MARDI and clone-by-clone mutational spectra looked remarkably similar (Fig. 3C). Most mutations were A to T transversions, with the mutated A located on the non-transcribed DNA strand. Importantly, the mutational spectrum derived from the mutations uniquely discovered by MARDI (i.e., not discovered by clone-by-clone) was consistent with this pattern (Fig. 3C).

DISCUSSION

In the present study, we simultaneously identified *Pig-a* mutations in heterogeneous pools of flow cytometry-derived CD48-deficient T cells through MARDI, a novel high-fidelity NGS technique. Direct comparisons with the standard clone-by-clone method provide several lines of evidence for MARDI's advantages. First, MARDI identified all mutations detected using clone-by-clone, except for a few located outside the *Pig-a* ORF (e.g., splice sites) or those that were complex in nature

(e.g., multi-base insertions/deletions). This shortfall was anticipated, since MARDI relied on mRNA/cDNA to detect *Pig-a* mutations. Second, MARDI and clone-by-clone mutation detection frequencies strongly correlated, indicating that MARDI accurately quantifies mutations. Third, the mutational spectrum found by MARDI closely resembles that obtained by clone-by-clone analysis. Fourth, by directly identifying mutations in pools of mutant cells, MARDI avoided the need to grow and genotype large numbers of clones, and eliminated clone proliferation bias. Fifth, MARDI simultaneously processed many more potential mutant cells than clone-by-clone analysis, providing a more refined spectrum of *Pig-a* ORF mutations induced by DMBA.

While we have previously identified *Pig-a* mutations by NGS, their detection and quantitation in heterogeneous pools of cells is much more challenging because many of them occur at low frequencies [Revollo et al., 2015]. Error rates of about 1% inherent to most NGS systems make it impossible to tell whether a sequence anomaly is a mutation or a mere sequencing error [Revollo et al., 2015]. Even with ultra-deep coverage, NGS on its own cannot identify mutations at frequencies lower than 1% and is, therefore, unsuitable for identifying mutations in heterogeneous cell pools. Successful attempts to overcome this deficiency have reported error rates lower than 10⁻⁵ [Schmitt et al., 2012; Lou et al., 2013]. Regrettably, these techniques rely on the use of random dsDNA linkers or ssDNA mini circles, both of which require laborious sample preparation and complex bioinformatics analysis.

As a simpler yet sufficiently accurate alternative, we used oligonucleotides carrying RDIs to tag progenitor *Pig-a* cDNA molecules and enable RDI clustering after PCR amplification and NGS. To identify mutations, we used the open source, web-based platform Galaxy, demonstrating that the bioinformatics tools needed for MARDI are widely available. Based on the error rate of our internal sequencing controls (0.7%) and our minimum clustering criteria ($n \geq 2$), we estimate the error rate of MARDI is lower than 10⁻⁴ (or 0.007², which represents the odds of two reads carrying the same error). Therefore, MARDI is well-suited to detect and quantify *Pig-a* mutations in heterogeneous pools of up to 10,000 cells. The absence of mutations observed in the sample of 600 CD48⁺ T cells derived from the vehicle-treated rat confirms its accuracy. Moreover, the discovery of several low-frequency *Pig-a* mutations not detected by clone-by-clone analysis in samples of 200 to 600 CD48⁻ T cells derived from the same DMBA-treated rats argues for its exceptional sensitivity. While we cannot rule out that some of these MARDI newly discovered low-frequency mutations are false-positives, the fact that all of them result in amino acid changes and that the resulting mutational spectrum is comparable to that derived from clone-

by-clone analysis suggest that they are *bona fide* mutations.

Another benefit of MARDI is the ease by which it measures the total fraction of mutations in cell pools. For the *Pig-a* assay, aggregating MARDI detection frequencies of individual *Pig-a* mutations in a given cell pool should account for the total fraction of mutant *Pig-a* cDNA molecules contained in that sample. By doing so, we conclude that approximately 92%, 87%, and 87% of *Pig-a* cDNA was mutated in the pools containing 350, 600, and 200 CD48⁻ T cells, respectively. The remaining small fractions of non-mutant *Pig-a* cDNA could result from flow cytometry errors, T-cell biology, or from mutations located outside the *Pig-a* ORF or unable to pass our bioinformatics inclusion criteria [Dobrovolsky et al., 2015]. In any case, it is clear that the vast majority of flow cytometry-derived CD48⁻ T cells from DMBA-treated rats bear *Pig-a* mutations.

While MARDI may appear applicable to many other mutation detection assays, two crucial factors must be carefully considered when designing an experiment with it: RDI diversity and NGS capacity. RDI diversity refers to the total number of clustering possibilities. Since the accuracy of MARDI rests on its ability to cluster sequence information of descendant DNA molecules, RDI diversity should be large enough to assign unique RDIs to each progenitor DNA molecule. Based on studies reporting the number of gene-specific mRNA molecules per cell, and assuming an overall 10% mRNA extraction and full-length *Pig-a* ORF cDNA conversion rate for each *Pig-a* mRNA molecule, we estimated that each tagging reaction would contain about two *Pig-a* cDNA molecules per cell (100 *Pig-a* mRNA molecules/cell × 10% conversion rate/5 tagging reactions) [Bengtsson et al., 2008; Taniguchi et al., 2009]. Therefore, 65,536 (or 4⁸ from N(8), where N = A, T, G, C) possible RDIs should have amply accommodated even our most diverse sample of 600 cells (odds of RDI sharing = [(600 cDNA/reaction × 2 RDIs/cDNA/reaction)/65,536 RDIs]²). In reality, our data imply that each tagging reaction contained about 0.5 *Pig-a* cDNA molecules per cell (i.e., [7,893 RDIs/1,750 cells/5 reactions]/[2 RDIs/cDNA molecule]), arguing that we used a sufficiently diverse RDI repertoire.

NGS capacity, or the number of DNA molecules an NGS system can analyze, must also be carefully considered when performing MARDI. Again, since the accuracy of MARDI rests on its ability to cluster sequence information of descendant DNA molecules, there would be no point in analyzing a sample containing 100,000 RDIs on an NGS system that can only process 100,000 DNA molecules. In such a case, the majority of reads would contain unmatchable RDIs and could not be used to confirm mutation findings. On the other extreme, analyzing a sample containing a mere 1,000 RDIs on the same NGS system would generate on average 100 reads per RDI, a

clear waste since only two reads per RDI are theoretically sufficient for an error rate lower than 10⁻⁴. Our data indicate that we had 4,155 unmatchable RDIs (7,893 total RDIs – 3,738 matchable RDIs) in 67,012 reads, and an average of 8.5 reads per RDI (67,012 reads/7,893 RDIs), values that we deem acceptable but with room for efficiency gains.

In summary, we report the development of MARDI, a technique capable of detecting mutations in heterogeneous cell pools. When applied to the *Pig-a* assay, MARDI detected *Pig-a* mutations in cell pools containing hundreds of CD48-deficient T lymphocytes. Direct comparisons with the clone-by-clone approach reveal that MARDI identified all expected mutations at comparable detection frequencies, generated a similar DMBA-mutational spectrum, and discovered additional low-frequency mutations. Because of its simplicity, accuracy, and sensitivity, MARDI promises to facilitate mutation discovery.

ACKNOWLEDGMENTS

The information in these materials is not a formal dissemination of information by the U.S. Food and Drug Administration and does not represent Agency position or policy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.R.R.—concept and design, molecular analysis, bioinformatics, manuscript preparation; N.M.C.—bioinformatics; M.G.P.—in vivo work, flow cytometry; M.M.P.M.—in vivo work, flow cytometry; V.N.D.—concept and design, in vivo work, flow cytometry, manuscript preparation.

REFERENCES

- Bengtsson M, Hemberg M, Rorsman P, Stahlberg A. 2008. Quantification of mRNA in single cells and modelling of RT-qPCR induced noise. *BMC Mol Biol* 9:63.
- Dobrovolsky VN, Revollo J, Pearce MG, Pacheco-Martinez MM, Lin H. 2015. CD48-deficient T-lymphocytes from DMBA-treated rats have de novo mutations in the endogenous *Pig-a* gene. *Environ Mol Mutagen* 56:674–683.
- Dunn DE, Yu J, Nagarajan S, Devetten M, Weichold FF, Medof ME, Young NS, Liu JM. 1996. A knock-out model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: *Pig-a*(-) hematopoiesis is reconstituted following intercellular transfer of GPI-anchored proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7938–7943.
- Gundry M, Vijg J. 2012. Direct mutation analysis by high-throughput sequencing: From germline to low-abundant, somatic variants. *Mutat Res* 729:1–15.
- Keller P, Tremml G, Rosti V, Bessler M. 1999. X inactivation and somatic cell selection rescue female mice carrying a *Piga*-null mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7479–7483.
- Lou DI, Hussmann JA, Mcbee RM, Acevedo A, Andino R, Press WH, Sawyer SL. 2013. High-throughput DNA sequencing errors are

- reduced by orders of magnitude using circle sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 110:19872–19877.
- Luzzatto L. 2006. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired X-linked genetic disease with somatic-cell mosaicism. Curr Opin Genet Dev 16:317–322.
- Miyata T, Takeda J, Iida Y, 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.
- Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T. 1999. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease. Am J Hematol 62: 175–182.
- Revollo J, Pearce MG, Petibone DM, Mittelstaedt RA, Dobrovolsky VN. 2015. Confirmation of Pig-a mutation in flow cytometry-identified CD48-deficient T-lymphocytes from F344 rats. Mutagenesis 30:315–324.
- Ross MG, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, Nusbaum C, Jaffe DB. 2013. Characterizing and measuring bias in sequence data. Genome Biol 14:R51.
- Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, Fox EJ, Hiatt JB, Loeb LA. 2012. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 109:14508–14513.
- Taniguchi K, Kajiyama T, Kambara H. 2009. Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR. Nat Methods 6:503–506.

Accepted by—
S. Dertinger