

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(Supl. 2): 5-12, 2018.

DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.156

EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN GRAVE EN LAS FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN EL GEN *Pig-a* EN RETICULOCITOS Y ERITROCITOS DE RATA

M. Monserrat Pacheco-Martínez^{a,b}, Edith Cortés- Barberena^a,
Leonor Rodríguez-Cruz^a y Rocío Ortiz-Muñoz^{a,*}

^aDepartamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México. ^bDoctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana.

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco #186, Ciudad de México 09340, México. *E-mail: arom@xanum.uam.mx

RESUMEN

La asimilación deficiente de alimentos por el organismo conduce a un estado patológico con distintos grados y manifestaciones clínicas, conocido como desnutrición.

En los últimos años ha surgido un nuevo ensayo *in vivo* de detección de mutación somática basado en el gen glucosilfosfatidilinositol de clase A (*Pig-a*). Este gen es necesario para la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que une proteínas específicas a la superficie de la célula. Cuando ocurre una mutación en *Pig-a*, no se puede sintetizar el GPI, ya que, las proteínas no se encuentran en la membrana celular, dando origen al fenotipo GPI negativo, el cual es de fácil detección por medio del análisis con citometría de flujo. En este estudio se utilizó el ensayo *Pig-a* para examinar el daño génico en ratas desnutridas expuestas al mutágeno N-etil-N-nitrosourea (ENU). Se efectuó el marcaje diferencial de reticulocitos (RET) y eritrocitos (E) de sangre periférica de rata de la cepa Wistar. Se tomó como indicador de daño al material genético de las células, el incremento en las frecuencias de mutantes (FM) *Pig-a*, que fueron analizadas en un 1 X 10⁶ células, durante 8 semanas. Los resultados muestran que la desnutrición grave por sí misma tiene un efecto dañino sobre la integridad del material genético. La frecuencia de mutantes se incrementó con base en la dosis de ENU y el tiempo de exposición en los grupos con desnutrición (DN).

Palabras clave: desnutrición, reticulocitos, eritrocitos, ensayo *Pig-a*, mutación génica, citometría de flujo.

Effect of severe malnutrition on mutation frequencies in the *Pig-a* gene in rat reticulocytes and erythrocytes

ABSTRACT

Poor assimilation of food in the body leads to malnutrition or undernutrition (UN), a pathological condition with varying degrees and clinical manifestations.

In recent years, a new test using *in vivo* somatic mutation detection based on the gene glycosylphosphatidylinositol Class A (*Pig-a*) has been developed.

This gene is 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 using flow cytometry. The *Pig-a* assay was used in this study to analyze gene damage in a malnutrition model exposed to mutagen N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). The assay was based on a differential staining of reticulocytes (RET) and erythrocytes (E) from peripheral blood of Wistar strain rats. Increased frequencies of mutant (MF) *Pig-a*, which were analyzed by 1 X 10⁶ cells for 8 weeks, indicated damage to the genetic material of cells. The results demonstrate that UN itself has a deleterious effect on the integrity of genetic material. The MF increased depending on the dose and the time rats were exposed to UN.

Keywords: malnutrition, undernutrition, ENU, reticulocytes, erythrocytes, *Pig-a* assay, mutation, flow cytometry.

INTRODUCCIÓN

La desnutrición (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; 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 el apropiado desarrollo y salud del organismo (Gómez, 2016; Rodríguez, Cervantes & Ortiz, 2011; Sahu *et al.*, 2015). Gómez, la clasificó en tres grados 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: de primer grado o leve (DN1°) con un déficit de peso entre el 10 y 24%, de segundo grado o moderada (DN2°) donde el déficit de peso está entre el 25 y 39% y de tercer grado o grave (DN3°) en este grado el déficit de peso es mayor al 40%.

En México entre 1988 y 2012, las prevalencias de los tres grados de DN han tenido disminuciones notables (Rivera, Irizarry & González-de Cossío, 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 y tiene prevalencia heterogénea en las regiones norte, centro, sur y, en las zonas urbanas y rurales del país (Gutiérrez *et al.*, 2012). 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).

Los ensayos genotóxicos de electroforesis unicelular y de micronúcleos (MN) han aportado valiosa información para el entendimiento de los efectos de la DN. Se ha observado que la DN causa daño al DNA, mismo que puede estar asociado con la presencia de infecciones y tratamientos farmacológicos a los que se someten los niños que presentan DN, también diferentes estudios indican que la DN produce daño celular *in vivo* y este daño puede producir efectos negativos para el desarrollo del organismo (Betancourt *et al.*, 1995; Ortiz *et al.*, 1997; Ortiz, Medina, Rodríguez, González-Márquez & Cortés, 2004).

La relación entre la DN y el daño genético ha sido ampliamente estudiada en humanos y en modelos animales (Ortiz, Medina, Rodríguez, González-Márquez & Cortés, 2004; Padula & Seoane, 2008; Ortiz, Medina, Cortés, Cervantes & Rodríguez, 2011). Recientemente se ha implementado un método a nivel génico, para estudiar los efectos de la DN tomando como indicador de daño las frecuencias de mutación (FM) somáticas en el gen *Pig-a* usando como controles positivos mutágenos y agentes potencialmente mutagénicos (Pacheco-Martínez *et al.*, 2016). El ensayo se realiza por medio de citometría de flujo. *Pig-a* es un gen que codifica la subunidad catalítica de la primera

enzima de la biosíntesis de glicosil fosfatidilinositol (GPI) que es una molécula cuya función es anclar proteínas, estas proteínas dependientes del GPI aparecen en la superficie celular, y pueden ser detectadas por los anticuerpos apropiados conjugados con fluorocromos (Bryce, Bemis & Dertinger, 2008). 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. 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 (Peruzzi, Araten, Notaro & Luzzatto, 2010). El ensayo *Pig-a in vivo* no requiere el uso de animales transgénicos y se realiza en tiempos cortos de procesamiento de muestra de sangre periférica de rata para la obtención de resultados de la frecuencia de mutación en RET (eritrocitos inmaduros) y E (eritrocitos maduros) (Pacheco-Martínez, Cervantes-Ríos, García-Rodríguez & Ortiz-Muñiz, 2014). En México se ha reportado el ensayo *Pig-a* en el modelo de inducción de DN2° por competencia de alimento durante la lactancia y después del destete (Pacheco-Martínez *et al.*, 2016). El objetivo de este estudio es evaluar las frecuencias de mutación en *Pig-a* en ratas con DN3° así como a la exposición al mutágeno ENU en RET y E provenientes de organismos con desnutrición grave o severa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales e inducción de la DN

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las guías aprobadas institucionalmente por la Universidad Autónoma Metropolitana y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Ratas de la cepa Han-Wistar se obtuvieron del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Ciudad de México. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de bioterio. Se utilizó el método de inducción de la DN por competencia de alimento durante la lactancia (Ortiz, Cortés, Pérez, González & Betancourt, 1996). Al día siguiente de su nacimiento, las ratas se distribuyeron en dos lotes: lote experimental (Desnutridas o DN) en los cuales se colocaron 16 crías con una nodriza y lote testigo (Bien Nutridas o BN), en el que se colocaron 6 crías con una nodriza. Durante los experimentos, las crías se pesaron cada dos días. Los datos registrados se utilizaron para calcular el déficit de peso de cada animal y así determinar el grado de DN que presentaron las crías. Bajo este criterio, se clasificaron con DN3° las ratas con un déficit de peso mayor de 40%.

A partir de la edad de 21 días (destete) se controló la ingesta de alimento de las crías para mantener la DN3°, para conseguirlo, se colocó la mitad de alimento al lote experimental con base al alimento colocado al lote testigo, se dio seguimiento de la cantidad de alimento consumido desde el día 21 hasta el día 65 de edad de las ratas, así como del peso y grado de DN del lote experimental.

Tratamiento con el mutágeno N-etil-N-nitrosourea (ENU)

Se administró ENU diluido en amortiguador de fosfatos (PBS, pH 6.0-6.1), vía oral de la siguiente forma:

Al día 14 de edad que fue anotado como día -1 con base en la administración de ENU, se administraron dos dosis, una de 10 mg y otra de 20 mg/kg de peso/3 días en intervalos de 24 horas (Phonethepswath *et al.*, 2010). Teniendo como dosis finales 30 mg y 60 mg. Con base en el estado nutricional y la dosis administrada, se conformaron los siguientes grupos de estudio:

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

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

Grupo 3 ratas BN con ENU, dosis 30 mg/kg/3 días ($n=8$).

Grupo 4 ratas BN con ENU, dosis 60 mg/kg/3 días ($n=8$).

Grupo 5 ratas DN con ENU, dosis 30 mg/kg/3 días ($n=5$).

Grupo 6 ratas DN con ENU, dosis 60 mg/kg/3 días ($n=5$).

En general se analizó una rata BN y una DN por grupo en cada experimento (una sin ENU, una con dosis 30 y una con dosis 60), pero en 3 ocasiones se estudiaron dos ratas BN en los diferentes grupos de estudio, por ello, en el grupo BN se incluyeron 8 ratas por grupo (24 en total) y en los DN se incluyeron 5 ratas (15 en total).

Toma de muestra de sangre periférica

Después de la última dosis de ENU se procedió a muestrear a los animales cada semana, los animales fueron manipulados a los 14, 23, 30, 37, 44, 51, 58 y 65 días de edad, como ya se mencionó, cada semana se realizó el muestreo que correspondió con la siguiente anotación de días después de la administración de ENU -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, la muestra fue obtenida de la vena caudal con ayuda de un bisturí. Se obtuvieron de 30-60 μ L de sangre, la cual fue colocada en tubos previamente heparinizados que se mantuvieron a 4°C hasta proceder al marcaje de las muestras (Phonethepswath *et al.*, 2010).

Detección de la mutación Pig-a (marcaje de las muestras)

Después de la colecta de sangre periférica, se tomaron 30 μ L de ésta y se transfirió a tubos que contenían 100 μ L de solución de heparina y 500 U/mL de amortiguador de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés de “phosphate buffered saline”). A cada muestra (130 μ L) se le adicionaron 155 μ L de PBS y se resuspendió por pipeteo suave, después se centrifugó a 800 g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 155 μ L de PBS que se mezclaron suavemente.

Posteriormente 150 μ L de esta suspensión se transfirieron a un tubo de polipropileno en el que previamente se colocaron 100 μ L de la siguiente mezcla: 3 partes de anti CD59-PE (anticuerpo contra CD59 conjugado con Ficoeritrina, para detectar la mutación por deficiencia en la expresión de esta proteína) + 17 partes de PBS con 2% de suero fetal bovino.

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

Análisis por citometría de Flujo

Se utilizó el citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson) con láser de argón a 488 nm de excitación. Se preparó una muestra de calibración del equipo para cada día de toma de una muestra. Se adquirieron 1×10^6 células y se desplegaron en gráficas de punto (*dot plot*) siguiendo una estrategia de selección de la región de análisis.

Selección de la región de análisis en las muestras de citometría de flujo

Se realizó la primera región con “Forward Scatter” (tamaño) contra “Side Scatter” (complejidad celular interna) para delimitar la región de células a analizar. Una segunda región se delimitó con FSC-Height contra SYTO 13 para excluir células nucleadas. La tercera región se hizo con FL2-Área contra FL2-Width para excluir dobletes y agregados celulares. La muestra de calibración se realizó cada día de toma de una muestra para identificar las poblaciones negativas y positivas del ensayo *Pig-a*.

Se utilizó el software CellQuest (versión 3.0.1, Becton Dickinson) para la adquisición de los datos en el citómetro de flujo y el software WinMDI 2.9 para el análisis de los datos. La frecuencia de mutación en RET fue determinada al analizar 3×10^5 RET totales y la frecuencia de mutación en E fue determinada por el análisis de 1×10^6 de las células totales.

Análisis estadístico de los resultados

Para cada grupo se calculó la frecuencia de RET CD59- y E CD59- por tiempo, con la finalidad de conocer la diferencia estadística entre los grupos no tratados con respecto a los grupos tratados con ENU, se utilizó una prueba de U de Mann-Whitney con una $p \leq 0.05$. Los cálculos se efectuaron usando el paquete estadístico Graph Pad Prism 6.0.

RESULTADOS

Se utilizaron 24 ratas bien nutridas (BN) y 15 ratas desnutridas (DN) de 14 días de edad, las cuales fueron distribuidas en los diferentes grupos tratados y no tratados con ENU. El peso promedio de las ratas BN y DN de un día de edad fue de 8.4 ± 0.5 g, al inducir la desnutrición experimentalmente; el peso promedio al inicio de los experimentos de las ratas BN fue de 31.7 ± 2.1 g y el de las ratas con DN3° de tercer grado fue 17.2 ± 6.3 g. En el Cuadro I se muestran los pesos promedio de las ratas BN y DN3° así como el porcentaje de déficit de peso, desde los

Días de edad	Días después de administrar ENU	Bien Nutridas	Desnutridas	% Déficit de peso
14	-1	31.7±2.1	17.2±6.3	45.7
23	7	55.9±3.0	32.1±13.5	42.5
30	14	83.1±4.3	44.2±18.3	46.9
37	21	108.3±7.1	45.5±16.6	57.9
44	28	141.9±8.3	58.4±18.4	58.9
51	35	180.2±5.6	64.0±11.3	64.5
58	42	216.2±7.4	84.3±16.8	61.0
65	49	252.8±16.1	117.4±13.5	53.6

Se presenta media $\pm$ error estándar del peso corporal en ratas BN y con DN3°, así como el porcentaje del déficit de peso, demostrando que el grado de desnutrición se mantuvo durante el estudio.

Cuadro I. Peso corporal y déficit de peso de ratas BN y con DN3°.

14 hasta los 65 días de edad. Los datos muestran que, desde el inicio de los tratamientos hasta el final de los mismos, el método de inducción de DN por competencia de alimento y restricción del 50% de alimento funcionó y se mantuvo el déficit de peso mayor al 40%, característico de la desnutrición grave.

Frecuencia de RET CD59- (FM-RET)

La FM *Pig-a* fue monitoreada durante un periodo de 49 días (8 semanas) en RET (Figura 1) de ratas BN y con DN3°, los resultados se muestran como el promedio $\pm$ E.E. La figura muestra los datos distribuidos en tres categorías de tratamiento: testigo y 30 ó 60 mg/kg/día ENU. En las ratas DN3° testigo, las FM de RET CD59- (FM-RET) fueron consistentemente más altas que el grupo BN testigo. Durante el período de estudio, el promedio de la FM-RET en el grupo BN testigo se mantuvo en $0.9-1.5 \times 10^6$, en el grupo con DN3° la frecuencia varió desde 15.3 a 32.7×10^6 (Figura 1, panel A).

Se observó aumento en la FM-RET dependiente de la dosis y tiempo tanto en las ratas BN como en las ratas DN3° expuestas a ENU. La exposición a la dosis de 30 mg ENU aumentó la FM en el gen *Pig-a* en RET de BN y DN3° con una FM mayor en los días 21, 28, 35 y 49 en el grupo desnutrido, la FM máxima en el grupo con DN3° fue de 98.2×10^6 y de 79.5×10^6 en el grupo BN en el día 49 (Figura 1, panel B). Con la dosis de 60 mg ENU el aumento se presentó en los días 14, 21, 28, 35, 42 y 49 en el grupo con DN; la FM-RET máxima se identificó el día 49 con 117.7×10^6 en el grupo BN y 195.3×10^6 para el grupo con DN3° (Figura 1, panel C).

Frecuencia de E CD59- (FM-E)

La FM en el gen *Pig-a* en E de ratas BN y con DN3° se presenta en la Figura 2, los resultados se muestran como el promedio $\pm$ E.E. Como ya se mencionó, los datos están distribuidos en tres

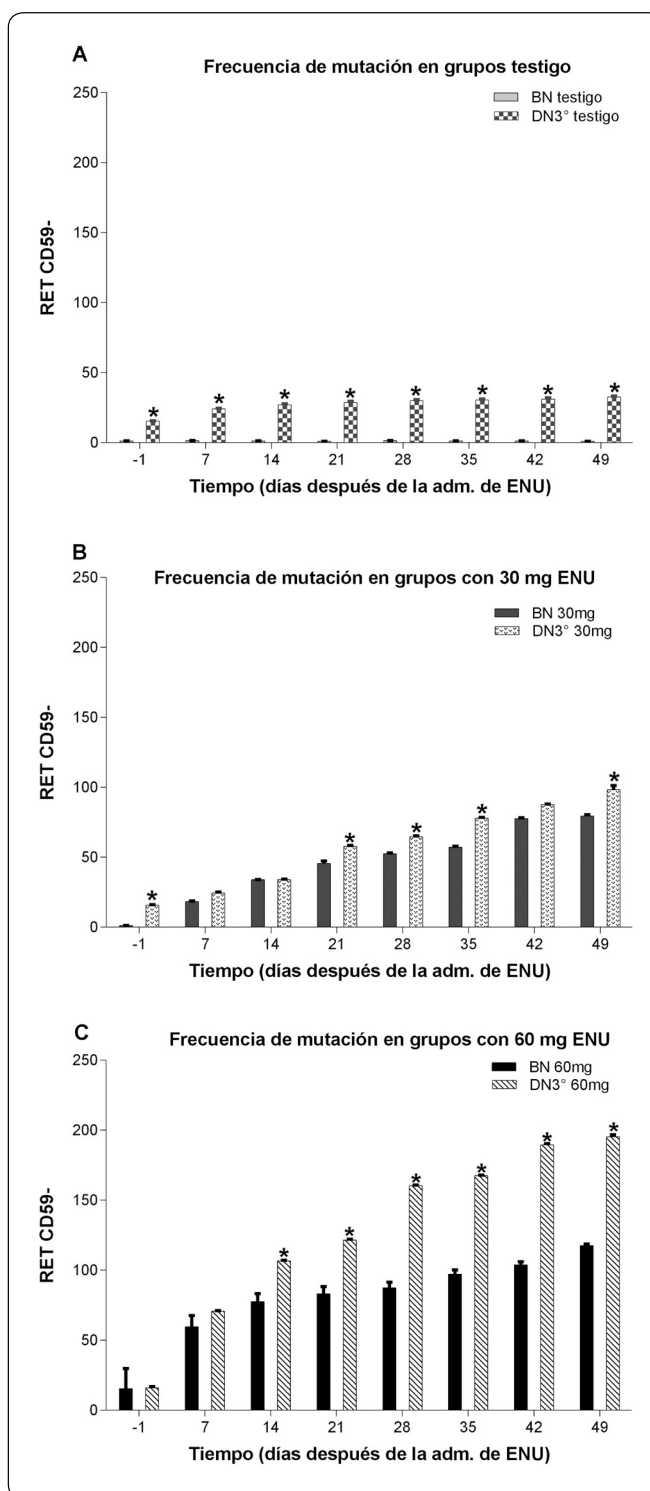


Figura 1. Frecuencia de mutación en RET de sangre periférica de ratas BN y con DN3°, testigo (sin tratamiento) y con 30 ó 60 mg/kg/ ENU. Todos los resultados están expresados como la media y el error estándar. Panel A muestra los grupos testigos BN y con DN3°, en el Panel B están los grupos BN y con DN3° con 30 mg/kg/ENU y en el Panel C se presenta a los grupos BN y con DN3° con 60 mg/kg/ENU. * Diferencias significativas entre los grupos BN y con DN3°; $p < 0.05$, $n = 6$.

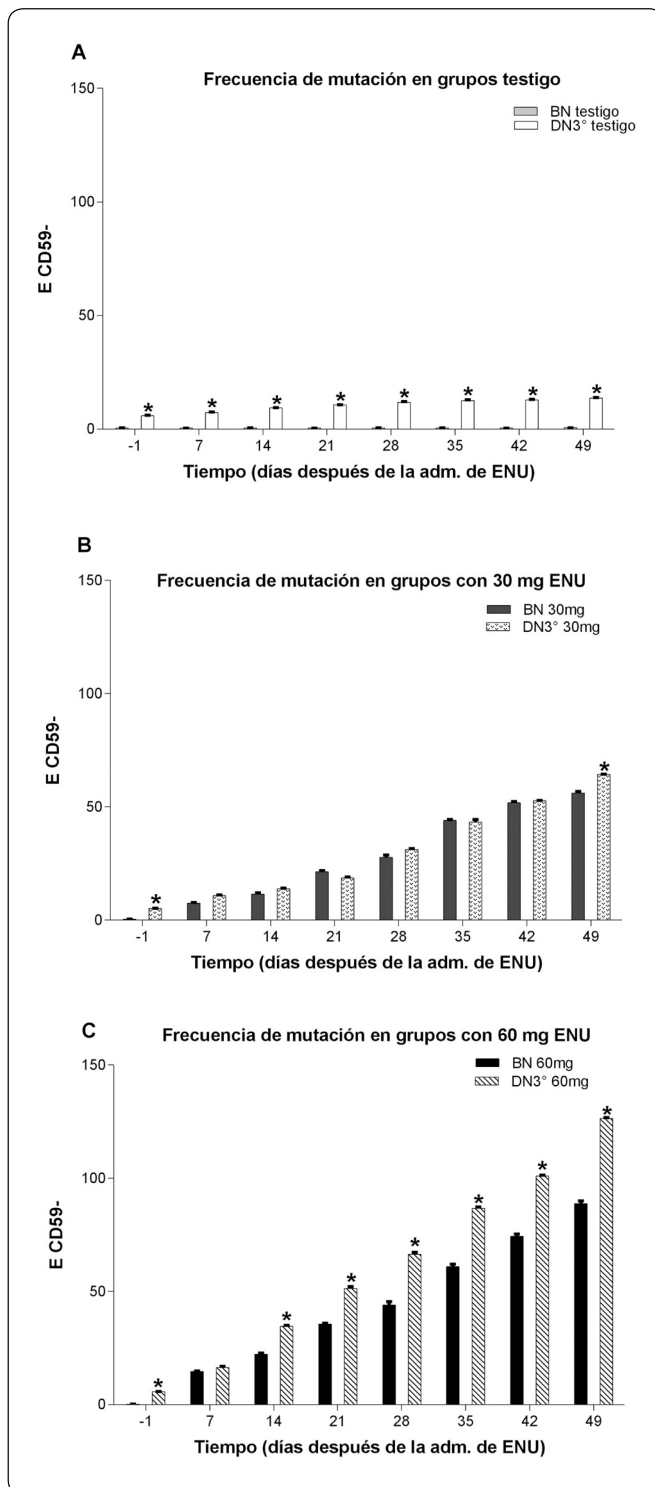


Figura 2. Frecuencia de mutación en E de sangre periférica de ratas BN y con DN3° testigo y con 30 ó 60 mg/kg/ ENU. Todos los resultados están expresados como la media y el error estándar. Panel A muestra los grupos testigos BN y con DN3°, en el Panel B están los grupos BN y con DN3° con 30 mg/kg/ENU y en el Panel C se presenta a los grupos BN y con DN3° con 60 mg/kg/ENU. * Diferencias significativas entre los grupos BN y con DN3°; $p \leq 0.05$, $n = 6$.

categorías de tratamiento: testigo y 30 ó 60 mg/kg/día ENU. En las ratas DN3° testigo, la FM en E CD59- fue consistente y se mantuvo incrementada en comparación con la observada en las ratas BN testigo (**Figura 2, Panel A**). Durante el período de estudio, el promedio de la FM de E CD59- (FM-E) en el grupo BN testigo fue de $0.3-0.4 \times 10^6$, en el grupo con DN3° la frecuencia varió desde $6.2-13.9 \times 10^6$.

La exposición a la dosis de 30 mg de ENU aumentó la FM *Pig-a* en los E de BN y DN3° con una FM significativamente mayor en el grupo desnutrido en el día 49, la FM-E máxima en el grupo con DN3° fue de 64.8×10^6 y de 56.1×10^6 en el grupo BN el día 49 (**Figura 2, panel B**). Con la dosis de 60 mg ENU el aumento se presentó en los días 14, 21, 28, 35, 42 y 49 en el grupo con DN; la mayor FM se registró en el día 49 con 88.7×10^6 en el grupo BN y 126.4×10^6 para el grupo con DN3° (**Figura 2, panel C**).

DISCUSIÓN

En el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, se ha utilizado el método de inducción de la DN por competencia de alimento durante la lactancia. En este trabajo se realizó una modificación después de los 21 días de edad (destete) que consistió en restringir el 50% de alimento al grupo experimental, con base al alimento colocado al lote testigo, para comprobar que se mantiene el grado de desnutrición se registró el peso de los grupos DN hasta los 65 días de edad.

Las frecuencias espontáneas o basales de mutantes *Pig-a* han sido reportadas para ratas Wistar de 35-42 días de edad. En el presente estudio las ratas empleadas en los experimentos fueron de 14 días de edad. A pesar de ello, los resultados de FM-RET son similares a los reportados por Bhalli *et al.*, 2011 de $3-6 \times 10^6$ y Dobrovolsky, Miura, Heflich & Dertinger, 2010., de 5×10^6 . Estos resultados indican que no hay diferencia asociada con la edad (35-42 en estudios previos y 14 días en este estudio). También sugieren que los controles del ensayo fueron adecuados.

La comparación entre las frecuencias espontáneas de mutantes en RET indica que éstas son aproximadamente 15 veces más en los organismos con DN que las frecuencias reportadas en organismos BN (15.3 a 32.7×10^6 vs 0.9 a 1.5×10^6 , respectivamente).

Con la dosis de 60 mg ENU se presentaron diferencias significativas a partir del día 14 y hasta el día 49, siendo el grupo DN3° el que presentó la mayor FM. Estos datos sugieren que la dosis de 60mg de ENU, es lo suficientemente potente para inducir mutantes *Pig-a* y que son los animales con DN3° los más afectados con una dosis alta del mutágeno, a su vez, el grupo DN testigo muestra las frecuencias de mutantes espontáneos más altas; esto demuestra que el daño en el material genético se encuentra asociado a la deficiencia de nutrientes.

Las frecuencias espontáneas FM-E es decir, las frecuencias previas a la administración de ENU en el (día -1) en las ratas BN, son de $0.3-0.4 \times 10^6$, estos datos son similares a los reportados por Bhalli *et al.*, 2011 donde se identificaron menos de 5×10^6 mutantes y Phonethepswath *et al.*, 2010 reportaron 1.3×10^6 espontáneos.

Los datos muestran que en organismos con DN3° las frecuencias espontáneas FM-E son aproximadamente 34 veces más que las frecuencias reportadas en el grupo BN testigo, no expuesto a mutágeno (0.4 vs. 13.9).

Por otra parte, se sugiere que los organismos con DN responden de manera tardía, por lo que con la dosis de 30 mg ENU la FM fue significativa hasta después de los 21 días en el caso de FM-RET y sólo a los 49 días para FM-E. Esta demora probablemente se relaciona con alteraciones en la proliferación y diferenciación de las células madre eritropoyéticas y retraso en la estancia de los reticulocitos en la médula ósea. Además, previamente se han reportado cambios en los porcentajes de progenitores eritroides, incremento en los tiempos de diferenciación celular y alteraciones en el ciclo celular de las células de la médula ósea de ratones desnutridos (Borelli *et al.*, 2009). Sin embargo, se requieren estudios de proliferación y diferenciación complementarios para comprobar los mecanismos por los cuales la DN propicia un retraso en la respuesta a la inducción de mutantes.

Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la DN a nivel citogenético en humanos y en modelos animales de experimentación, éstos últimos han sido usados para estudios *in vivo* e *in vitro* y en diferentes tipos de células (Ortiz, Medina, Cortés, Cervantes & Rodríguez, 2011). Se ha analizado la frecuencia de micronúcleos en RET de sangre periférica de ratas DN expuestas a la Mitomicina C (Ortiz, Medina, Rodríguez, González-Márquez & Cortés, 2004), y en ratas con DN3° tratadas con fármacos (Ortiz, Medina, Cortés, Cervantes & Rodríguez, 2011). En ellos se evidenció una elevada frecuencia de micronúcleos que refleja un importante daño al DNA.

Se ha propuesto que diversos mecanismos están relacionados con el daño en el DNA observado en los organismos desnutridos. Se opina que puede estar asociado con la deficiencia de proteínas esenciales para la integridad del DNA y también carencia de las requeridas para la reparación del daño al DNA (Betancourt *et al.*, 1995). Asimismo, se ha reportado que en los organismos con desnutrición, los sistemas antioxidantes son poco eficientes y presentan deficiencia de zinc. Por otro lado, el rompimiento de la cadena de DNA podría estar relacionado con un incremento en la presencia de algunas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Cuando las ERO se encuentran por encima de ciertos niveles, el balance oxidantes/antioxidantes se pierde y es entonces cuando algunas ERO pueden provocar rupturas en el DNA (Jain, Varma, Agrawal & Jadhav, 2008).

Además, se ha evidenciado el importante papel de vitaminas y minerales para prevenir la inestabilidad genómica. Así, diversos estudios han demostrado que la deficiencia en las vitaminas C, E y D causa oxidación del DNA, daño cromosómico y rompimiento de doble cadena de DNA; también se ha demostrado que el folato y la vitamina B12 son necesarios para prevenir el daño en el DNA (Fenech, 2002).

El presente trabajo apoya y complementa las observaciones anteriores. En un estudio reciente (Pacheco-Martínez *et al.*, 2016) observaron un incremento en la frecuencia espontánea de mutantes en el gen *Pig-a* en ratas con desnutrición moderada, datos que coinciden con los aquí presentados. Sin embargo, se observó que al ser expuestas a ENU las FM fueron menores en las ratas DN2°, con respecto a las BN, aunque esas diferencias no fueron significativas. Esos datos son diferentes a los obtenidos en el presente estudio, ya que encontramos un incremento en las FM en los organismos DN expuestos a ENU, lo que indica que la desnutrición de tercer grado (DN3°) tiene efectos mayores que la DN moderada, incluyendo una mayor susceptibilidad a los mutágenos.

En cuanto a la respuesta ante ENU, los grupos de estudio respondieron incrementando las frecuencias de mutantes para ambas estirpes celulares. El grupo DN3° de 60 mg (dosis alta) presentó mayor frecuencia de mutantes en los análisis de RET y E, esto demuestra que la DN3° más una dosis alta de ENU, dan como resultado incrementos considerables en las frecuencias de mutantes.

La dosis de 30 mg (dosis baja) mostró diferencias, aunque significativas, no muy pronunciadas entre los días 21-35 y 49, esto sugiere que, a dosis bajas se están presentando mecanismos de reparación del material genético y se está contrarrestando el daño inducido por ENU. Esto podría relacionarse con la mayor capacidad que tiene la rata de reparación de aductos en el DNA, mediante la actividad de la proteína O (6)-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT) (Gerson, Trey, Miller & Berger, 1986), la cual ofrece protección contra la formación de mutaciones de transición como GC → AT inducidas por agentes alquilantes, se sugiere que este mecanismo sea el que esté reduciendo los daños inducidos por la dosis de 30 mg ENU.

En este estudio se reportan incrementos en las FM en el gen *Pig-a* tanto en RET como en E, lo cual sugiere que, a nivel genético, la deficiencia de nutrientes presente en la DN3° está asociada con un aumento de mutaciones somáticas, tomando como indicador el ensayo *Pig-a*.

Cabe señalar que éste es el primer trabajo que reporta el efecto de la DN3° mediante el ensayo *Pig-a* en un modelo de inducción de DN que abarcó la etapa de lactancia y juventud de ratas que fueron expuestas a un mutágeno.

El ensayo *Pig-a* es de reciente introducción en México y ha permitido realizar la detección de los fenotipos mutantes y el análisis de los mismos en dos poblaciones celulares de manera simultánea en todas las semanas de los experimentos aquí descritos. Los reportes iniciales de los ensayos en roedores, utilizando el gen *Pig-a* como reportero de mutación somática fueron de (Bryce, Bemis & Dertinger, 2008; Miura, Dobrovolsky, Kasahara, Katsuura & Heflich, 2008; Phonetheswath, Bryce, Bemis & Dertinger, 2008). Estos trabajos demostraron que el ensayo *Pig-a* es capaz de evidenciar incrementos significativos en los fenotipos mutantes en ratones expuestos a potentes mutágenos. Asimismo, se evidenció que el ensayo presenta diversas ventajas, dentro de ellas se mencionan: es relativamente rápido, de bajo costo, requiere muestras extremadamente pequeñas de sangre y tiene una extraordinaria sensibilidad al conjunto de mutágenos probados. La incorporación de un colorante de ácidos nucleicos en el procedimiento de marcaje, ha proporcionado la posibilidad de medir por separado la incidencia del fenotipo mutante en dos tipos celulares: RET (eritrocitos inmaduros) y E (eritrocitos maduros) de sangre periférica (Phonetheswath *et al.*, 2010). El ensayo *Pig-a* demostró ser transferible y altamente reproducible bajo las condiciones de nuestro laboratorio, con base en la experiencia adquirida se tiene la posibilidad de usarlo para diversas aplicaciones en la investigación básica y clínica de las probables alteraciones relacionadas con alimentación y nutrición.

CONCLUSIONES

El modelo de inducción de DN hasta los 65 días de edad mediante restricción de alimento fue adecuado para los experimentos.

El ensayo *Pig-a* detecta los fenotipos negativos a la proteína dependiente de GPI CD59 y brinda información suficiente para obtener las frecuencias de mutantes.

La DN3° genera daño al DNA evidenciado en la alta FM presente en el grupo con DN no expuesto al mutágeno.

El consistente incremento en la FM en RET y E observado en las ratas con desnutrición grave (DN3°) tratadas con 60 mg de ENU demuestra que el daño es mayor al observado en el grupo BN con la misma dosis de ENU.

El ensayo *Pig-a* es un buen indicador de mutaciones en este gen en modelos de inducción de DN y tiene diversas aplicaciones de índole genotoxicológico y clínico.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a los Doctores Javed A. Bhalli y Robert Heflich por sus comentarios y sugerencias para este trabajo, así como a la M. en C. Amelia Ortiz Muñiz por la lectura del manuscrito.

APOYOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por medio de la beca otorgada para estudios de posgrado (248814) a M. Monserrat Pacheco-Martínez.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Betancourt, M., Ortiz, R., González, C., Pérez, P., Cortés, L., Rodríguez, L. & Villaseñor, L. (1995). Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat Res.*, **331(1)**, 65-77. DOI: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00052-K](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00052-K).
- Bhalli, J.A., Shaddock, J.G., Pearce, M.G., Dobrovolsky, V.N., Cao, X., Heflich, R.H. & Vohr H.W. (2011). Report on stage III *Pig-a* mutation assays using benzo[a]pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.*, **52(9)**, 731-737. DOI: 10.1002/em.20675.
- Black, R.E., Allen, L.H., Bhutta, Z.A., Caulfield, L.E., de Onis, M., Ezzati, M., Mathers, C. & Rivera, J. (2008). Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*, **371 (9608)**, 243-260. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61690-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61690-0).
- Borelli, P., Barros, F.E., Nakajima, K., Blatt, S.L., Beutler, B., Pereira, J., Tsujita, M., Favero, G.M. & Fock, R.A. (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(6)**, 523-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2009000600008>.
- Bryce, S.M., Bemis, J.C. & Dertinger, S.D. (2008). *In vivo* mutation assay based on the endogenous *Pig-a* locus. *Environ. Mol. Mutagen.*, **49(4)**, 256-264. DOI: 10.1002/em.20379.
- Chang, C.Y., Trehan, I., Wang, R.J., Thakwalakwa, C., Maleta, K., Deitchler, M. & Manary, M.J. (2013). Children successfully treated for moderate acute malnutrition remain at risk for malnutrition and death in the subsequent year after recovery. *J. Nutr.*, **143(2)**, 215-220. DOI: 10.3945/jn.112.168047.
- Dobrovolsky, V.N., Miura, D., Heflich, R.H. & Dertinger, S.D. (2010). The *in vivo* *Pig-a* gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment. *Environ. Mol. Mutagen.*, **51(8-9)**, 825-835. DOI: 10.1002/em.20627.
- Fenech, M. (2002). Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs), *Food Chem. Toxicol.*, **40(8)**, 1113-1117. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00028-5).
- Gerson, S.L., Trey, J.E., Miller, K. & Berger, N.A. (1986). Comparison of O6 alkylguanine DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*, **7(5)**, 745-749.
- Gómez, F. (2016). Desnutrición. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, **73**, 297-301. DOI: 10.1016/j.bmhmx.2016.07.002. Este artículo fue publicado por primera vez en 1946. En el presente número se reproduce como un homenaje al septuagésimo aniversario de este trabajo.
- Gutiérrez, J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-

- Martínez, M. & Hernández-Ávila, M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: *Instituto Nacional de Salud Pública (MX)*, 147-153. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- Jain, A., Varma, M., Agrawal, B.K. & Jadhav A.A. (2008). Serum zinc and malondialdehyde concentrations and their relation to total antioxidant capacity in protein energy malnutrition. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **54(5)**, 392-395. DOI: <https://doi.org/10.3177/jnsv.54.392>.
- Miura, D., Dobrovolsky, V.N., Kasahara, Y., Katsuura, Y. & Heflich, R.H. (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(8)**, 614-621. DOI: 10.1002/em.20414.
- Ortiz, R., Cortés, E., Pérez, L., González, C. & 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.*, **30(4)**, 363-370. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280.
- 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(3)**, 179-185. DOI: 10.1002/em.20009.
- 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(8)**, 673-680. DOI: 10.1002/em.20670.
- Pacheco Martínez, M.M., Cervantes Ríos, E., García Rodríguez, M.C. & Ortiz Muñoz, A.R. (2014) El gen *PIG-A* como indicador de mutaciones somáticas *In vivo*. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, **30**, 53-65. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37033725007>.
- Pacheco-Martínez, M.M., Cortés-Barberena, E., Cervantes-Ríos, E., García-Rodríguez, M.C., Rodríguez-Cruz, L. & Ortiz-Muñoz, R. (2016). Moderate malnutrition in rats induces somatic gene mutations. *Mutat. Res.*, **789(Jul)**, 26-32. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2016.01.008.
- Padula, G. & Seoane, A. (2008). Chromosomal effects of infections in malnourished and eutrophic children of Gran La Plata. *BAG, J. basic appl. Genet.*, **19(1)**, 15-20. Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-6232008000100003&lng=es&nrm=iso.
- Peruzzi, B., Araten, D.J., 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(1)**, 3-10. DOI: 10.1016/j.mrrev.2009.12.004.
- Phonetheswath, S., Bryce, S.M., Bemis, J.C. & Dertinger, S.D. (2008). Erythrocyte based *Pig-a* gene mutation assay: Demonstration of cross species potential. *Mutat. Res.*, **657(2)**, 122-126. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.08.011.
- 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. & Dertinger, S.D. (2010). *Pig-a* mutation: kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens. *Toxicol. Sci.*, **114(1)**, 59-70. DOI: 10.1093/toxsci/kfp289.
- Rivera, J.A., Irizarry, L. & González-de Cossío, T. (2009). Overview of the Nutritional status of the Mexican population in the last two decades. *Salud Pública Mex.*, **51 (Suppl. 4)**, S645-656.
- Rodríguez, L., Cervantes, E. & Ortiz, R. (2011). Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: A public health problem. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **8(4)**, 1174-1205. DOI: 10.3390/ijerph8041174.
- Sahu, S.K., Kumar, S.G., Bhat, B.V., Premarajan, K.C., Sarkar, S., Roy, G. & Joseph, N. (2015). Malnutrition among under-five children in India and strategies for control. *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, **6(1)**, 18-23. DOI: 10.4103/0976-9668.149072.