

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).

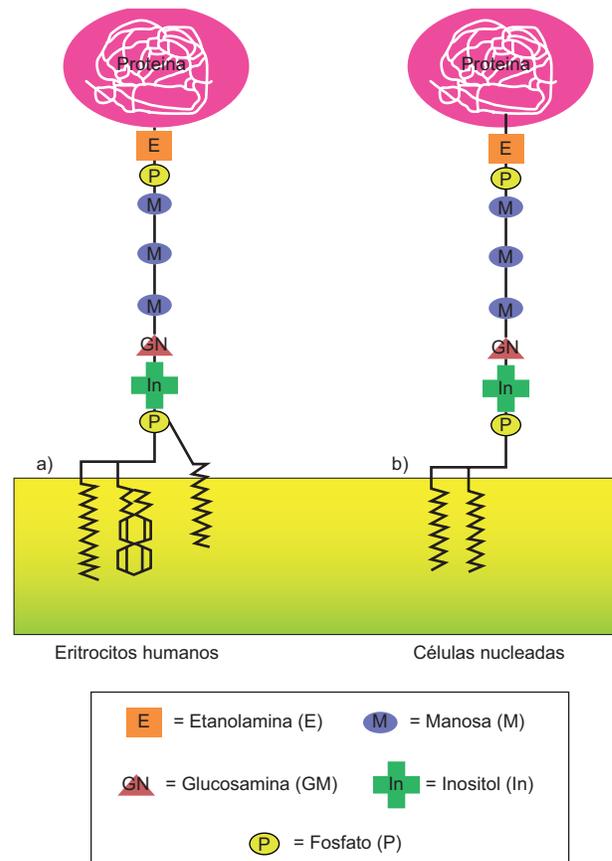


Fig. 1. Estructura de la molécula GPI, modificado de Kinoshita 2008.

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

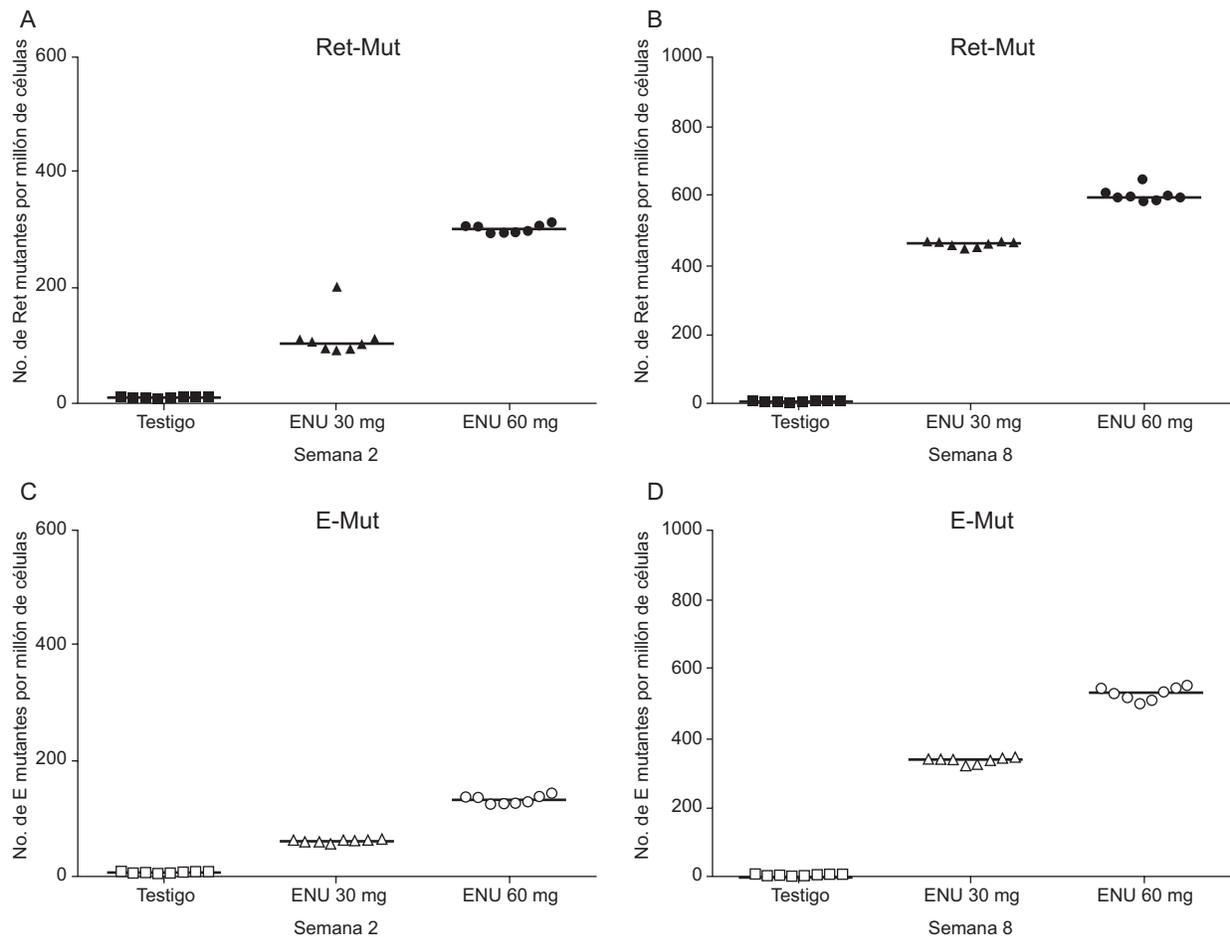


Fig. 2. Medianas de las frecuencias de mutantes en los grupos testigo y tratados con dosis de 30 y 60 mg de ENU. **A:** frecuencia de RET-MUT en la semana 2, después de la administración de ENU. **B:** inducción de mutantes RET-MUT en la semana 8. **C:** frecuencia de E-MUT en la semana 2 y **D:** frecuencia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