



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

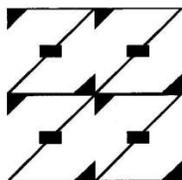
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

**EFFECTO GENOTÓXICO DE *TAENIA SOLIUM* Y DE
LA CALRETICULINA EN EL MODELO DE
TENIOSIS EN HÁMSTER**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

SEVILLA SEVILLA JUAN ANTONIO

FES ZARAGOZA
UNAM



DIRECTOR DE TESIS
DRA. SALAZAR MARTÍNEZ ANA MARÍA

ASESOR INTERNO
DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Si pudieran concederme un deseo, no pediría riqueza, ni poder,
si no el sentido del apasionamiento hacia lo que puede llegar a ser,
por el ojo que, siempre joven y ardiente, ve lo posible. El placer
defrauda, la posibilidad no lo hace nunca. ¿Que vino es más
aromático, más incitante, más embriagador que la excitante posibilidad?*
SØREN KIERKEGAARD

“Los imperios de la mente serán los imperios del futuro”

WINSTON CHURCHILL

Vivimos en un universo de lo posible... Donde todo está inventado

BENJAMIN ZANDER

ROSAMUND STONE ZANDER

A mi Madre Apolonia Sevilla Sandoval, A mi Padre Juan Sevilla Agustín; Por su apoyo, por su valor, por creer en mí, por el amor que me brindan, por el cuidado que me han dado, por enseñarme a luchar por lo que quiero y no rendirme.

A mis Hermanos: Olivia Sevilla Sevilla, Marta Sevilla Sevilla, Israel Sevilla Sevilla: Por todos los momentos felices que hemos compartido, por sus consejos, por apoyarme cuando los necesito.

A Berenice Villa Cortes; Por tu Amor, tu paciencia, por todo lo que hemos compartido juntos.

A mis amigos de la Facultad, de Laboratorio, a todos.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	Asociación entre el cáncer y las infecciones por parásitos	2
2.2.	Helmintos y cáncer	4
	a) Schistosomiasis	
	b) <i>Schistosoma haematobium</i>	
	c) <i>Schistosoma mansoni</i> y <i>Schistosoma japonicum</i>	
2.3.	El helminto <i>Taenia solium</i>	8
2.4.	Factor soluble secretado por el parásito	10
2.5.	La respuesta inmune ante la infección por helmintos	11
2.6.	El papel de la calreticulina (CRT) en la infección	13
2.7.	La prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica como indicador de genotoxicidad	14
3.	JUSTIFICACIÓN	18
4.	HIPÓTESIS	19
5.	OBJETIVOS	20
6.	MÉTODO	21

6.1.	Infección con <i>Taenia solium</i> e inmunizaciones	21
6.2.	Infección con <i>Taenia solium</i>	21
6.3.	Inmunización e infección	22
	a) Hámster 3 meses de edad	
	b) Hámster 9 meses de edad	
6.4.	Obtención de la muestra de sangre	24
6.5.	Evaluación de micronúcleos (MN) en eritrocitos de sangre periférica	24
6.6.	Vacunación	25
6.7.	Análisis estadístico	25
7.	RESULTADOS	26
8.	DISCUSIÓN	35
9.	CONCLUSIONES	40
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. RESUMEN

La neurocisticercosis, enfermedad considerada como un problema de salud pública, se asocia con neoplasias en el cerebro. La neurocisticercosis y la teniosis son dos enfermedades en el ser humano causadas por el helminto *Taenia solium*. Se ha reportado que un factor soluble secretado por *T. solium* induce transformación en células SHE y daño genotóxico en cultivos de linfocitos humanos. Por otra parte, se ha demostrado que la vacunación vía oral con calreticulina recombinante de *T. solium* induce una protección contra la infección en el modelo de teniosis en hámster. Considerando que el daño en el material genético podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer, en este estudio se evaluó: 1) la influencia de la edad en la frecuencia basal de micronúcleos (MN) en reticulocitos (RET) en la sangre periférica en hámsteres de 3 y 9 meses de edad, 2) el efecto genotóxico producido por la infección con *T. solium* en hámsteres infectados con cisticercos durante 3, 7, 10, 20 y 30 días y 3) el efecto de la inmunización con calreticulina en la inducción de MN en hámsteres. Se tomaron muestras de sangre periférica por punción de la vena retro-orbital de los animales. Para el estudio de MN en eritrocitos se realizaron frotis y se tiñeron con naranja de acridina. Las laminillas se analizaron en un microscopio de fluorescencia. Se analizaron 2000 RET por cada animal. Los resultados muestran que: 1) la frecuencia basal de MN tiende a aumentar con la edad, 2) la infección con *T. solium* produce daño genotóxico *in vivo* de manera dependiente del tiempo de infección y 3) la calreticulina disminuye el daño genotóxico inducido por el parásito, debido al efecto protector de la inmunización contra el parásito.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Asociación entre el cáncer y las infecciones por parásitos

Existe una fuerte evidencia que sugiere que los carcinógenos biológicos son una causa importante de cáncer en humanos. Se ha estimado que las infecciones crónicas causadas por virus, bacterias y parásitos contribuyen con el 17.8% de cáncer en el mundo, y se estima que en los países en desarrollo en donde las infecciones no son tratadas a tiempo, sería hasta de un 26.3%. Sólo una proporción relativamente pequeña de las infecciones relacionadas con cáncer pueden atribuirse a infecciones causadas por helmintos. Estas infecciones son las más frecuentes en las poblaciones pobres de los países en desarrollo, que no tienen el acceso a una atención médica adecuada o no cuentan con medidas de prevención eficaces. De lo anterior se deduce que los tipos de cáncer inducidos por helmintos son también más frecuentes en estas áreas y en estas condiciones [1,2].

Aunque algunos parásitos, en particular los helmintos, han sido implicados en la etiología de cáncer en humanos, aún no es claro, el conocimiento de los mecanismos por los cuales los parásitos inducen transformaciones malignas en las células del hospedero. Se ha propuesto que las infecciones en general pueden iniciar o promover la carcinogénesis por algunos de estos tres principales mecanismos [3]:

- 1) Inflamación crónica, debido a una prolongada persistencia de agentes infecciosos en el hospedero.
- 2) Inserción de actividad oncogénica en el genoma del hospedero.
- 3) Reducción de la inmunovigilancia como resultado de la inmunosupresión.

La inflamación crónica es ampliamente relacionada con la carcinogénesis inducida por las helmintiasis. El desarrollo del cáncer relacionado con helmintos a menudo requiere de una infección por varios años, que resulta en una inflamación crónica de los tejidos [1].

La carcinogénesis es un proceso complejo, en el que un crecimiento normal de las células es modificado como resultado de la interacción con múltiples factores, incluyendo xenobióticos y componentes endógenos [1,2].

Al establecer una asociación entre infección por helmintos y cáncer se presenta un desafío, debido al periodo de latencia (o tiempo de infección) y otras condiciones, durante el cual numerosos factores pueden desempeñar un papel. Por ejemplo las personas que viven en áreas endémicas de helmintos suelen estar expuestas a infecciones múltiples, así como a otros xenobióticos, como las aflatoxinas. Esto podría ocultar una causa relación entre infección por helmintos y cáncer, o carcinogenesis que en realidad puede ser el resultado de una interacción entre múltiples factores de riesgo para el desarrollo de cáncer. Un factor de complicación es el tiempo en que se desarrolla el cáncer, en el cual puede no ser posible encontrar huevos del parásito como un signo de una infección por helmintos específicos [1,2]. Además en ocasiones la infección es un resultado de una acumulación consecutiva de infecciones.

2.2. Helmintos y cáncer

a) Schistosomiasis

La schistosomiasis es una de las infecciones parasitarias más difundida en los seres humanos causada por el trematodo que vive en la sangre del huésped. El principal causante de esta enfermedad en el ser humano son las especies *S. haematobium*, *S. mansoni*, y *S. japonicum*. La schistosomiasis es endémica en aproximadamente 74 países tropicales y subtropicales. Aproximadamente 200 millones de personas están actualmente infectadas y más de 700 millones están en riesgo de contraer la enfermedad [1,3].

b) *Schistosoma haematobium*

La infección por *S. haematobium* afecta el tracto genitourinario. Los huevos de este parásito son depositados en grandes conglomerados en la pared de la vejiga, donde se liberan en la orina, provocando ulceraciones y hematuria. Como consecuencia, los huevos retenidos en la pared de la vejiga producen inflamación y engrosamiento de la pared de la vejiga [1,3].

Chen y Mott observaron que el cáncer de vejiga, especialmente los carcinomas de células escamosas, fueron geográficamente asociados con la infección por *S. haematobium* y que esta asociación estaba relacionada con la endemicidad de la infección. El cáncer de vejiga representa cerca del 30.8% del total de la incidencia de cánceres en Egipto, donde es el segundo tipo de cáncer más común en hombres y mujeres. Igualmente, en países como Iraq, Zambia, Malawi y Kuwait, dado que *S. haematobium* está presente, el cáncer de vejiga es el tipo más común. En las zonas endémicas con una alta carga parasitaria y un alto riesgo de exposición a la infección por *S. haematobium*, el carcinoma de células escamosas es el tipo histológicamente más frecuente. En estudios caso-control, se ha mostrado asociaciones positivamente significativas entre la ocurrencia de cáncer de vejiga urinaria e infección con *S. haematobium*. El más reciente estudio realizado en Egipto, encontró un rango alto de probabilidad para la schistosomiasis urinaria, la cual sugiere una relación

entre la duración de la infección y un efecto a largo plazo respectivo con el cáncer de vejiga [1,3].

Numerosos mecanismos han sido sugeridos para explicar cómo *S. haematobium* induce el proceso de carcinogenesis. La información disponible indica que este es un proceso con múltiples etapas, en el cual participan varios mecanismos, como inflamación crónica. Los huevecillos de *S. haematobium* inducen inflamación crónica e irritación en la vejiga urinaria, lo cual parece estar asociado con un mayor riesgo para desarrollar cáncer en el sitio de inflamación. La respuesta inflamatoria alrededor de los huevos da lugar a factores genotóxicos y productos que pueden causar inestabilidad genómica, así como estimular una respuesta proliferativa de las células del huésped para reparar el daño causado en el tejido a causa de la inflamación. Los eosinófilos se encuentran en alta concentración en la orina de personas infectadas con *S. haematobium* y el nivel de eosinófilos en orina se correlaciona positivamente con el grado de inflamación del tracto urinario. Esta es una evidencia del papel que tienen las especies reactivas de oxígeno en la etiología del cáncer y de las células inflamatorias tal como los eosinófilos que son una fuente endógena importante de radicales de oxígeno [1,3].

La inestabilidad genética en las células del huésped puede dar lugar a modificaciones en la regulación de los genes supresor de tumores y oncogenes e interferir con el control de la proliferación celular [1,3].

Mucha de la información acerca de la genotoxicidad relacionada a la infección con *S. haematobium* se deriva a partir de muestras de tejido de vejiga provenientes de pacientes con cáncer, los cuales tenían huevos de *S. haematobium* en el tejido de vejiga y/o con antecedentes de exposición a la esquistosomiasis [1,3]. La mayoría de estos estudios han sido exhaustivamente revisados y representan varios mecanismos, tales como aductos al DNA, metilación en genes, supresión y/o mutaciones en los genes supresores de tumores, oncogenes o genes asociados con el control del ciclo celular. Particularmente, mutaciones en el gen supresor de tumores p53 se han observado con más frecuencia en pacientes con esquistosomiasis asociado con cáncer de vejiga que en pacientes con cáncer de vejiga no

relacionados con la esquistosomiasis. Estos cambios pueden conducir a una inestabilidad genética e incrementar la probabilidad de una conversión maligna. Los elevados niveles de marcadores de estrés oxidativo y la expresión de oncoproteínas, tales como bcl-2 y p53, también se han observado en la esquistosomiasis asociada a cáncer de vejiga [1].

c) *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*

A diferencia de *S. haematobium*, no se han reportado datos que vinculen la ocurrencia geográfica de cáncer por la infección con *S. mansoni*. Los casos reportados han vinculado cáncer de hígado, colorectal y cáncer de próstata por infección con *S. mansoni* [4] y se han encontrado grandes linfomas foliculares en 1577 pacientes con esquistosomiasis a los cuales se les ha extirpado el bazo [1,3,5,6].

Datos clínicos han demostrado alteraciones enzimáticas en individuos infectados con *S. mansoni* con una disminución de los niveles hepáticos de citocromo p450 y NADPH citocromo C reductasa. En estudios *in vitro* se ha demostrado que estas alteraciones enzimáticas producen un mayor aumento en un 300% en la producción de metabolitos de aflatoxinas. Esto puede indicar un papel para *S. mansoni* como potenciar el efecto de los carcinógenos medioambientales y por tanto, indirectamente incrementar el riesgo de cáncer [1,7].

Varios estudios epidemiológicos han indicado una asociación geográfica entre la infección por *S. japonicum* y cáncer de hígado y de colon, pero un problema con muchos de estos estudios es que no toman en cuenta ciertos factores de riesgo como una infección por hepatitis viral, aflatoxinas y otros carcinógenos en la dieta [1].

En un estudio de casos-contróles, en el que se evaluaron sólo los casos negativos para hepatitis viral, realizado por Qui, *et al*, se observó la asociación entre cáncer de hígado así como de colon por la infección con *S. japonicum* en Sichuan, China. De un total de 127 pacientes con cáncer de hígado y 142 pacientes con cáncer de colon se incluyeron junto con

los controles apareados. Infecciones previas con *S. japonicum* se asociaron con cáncer de hígado y colon [1].

Un incremento significativo en la prevalencia de tumores de hígado se observó en ratones infectados con *S. japonicum*, así como los expuestos al carcinógeno 2-acetilaminofluoreno en la dieta [8]. Varios estudios han indicado que los ratones infectados con *S. japonicum* se reduce su capacidad de metabolizar múgatenos [9,10]. Mutaciones genéticas en el gen supresor de tumores p53 fueron estudiados en 44 pacientes de origen asiático con cáncer rectal, los resultados pueden indicar que las mutaciones surgen de agentes genotóxicos endógenos producidos durante la infección con *S. japonicum* [1,11].

La IARC (International Agency for Research on Cancer) ha clasificado a la infección con *S. haematobium* dentro del grupo 1, debido a que existe evidencia suficiente para considerar a este parásito como carcinógeno para los seres humanos. Mientras que por la evidencia limitada para carcinogenicidad por *S. japonicum* en los seres humanos, este ha sido clasificado dentro del grupo 2B, como posible carcinógeno para humanos. La evidencia es insuficiente para apoyar a *S. mansoni* como carcinógeno en humanos, y ha sido clasificado dentro del grupo 3 [1,3].

2.3. El helminto *Taenia solium*

Hay pocos informes sobre el papel que tienen los helmintos en la carcinogénesis. Se ha demostrado que un factor soluble secretado por *Taenia solium* ejerce un efecto de inmunodepresión e induce daño al DNA en linfocitos *in vitro*, así como extractos de *T. solium* tiene un efecto genotóxico en *Drosophila melanogaster* [1]. Por otra parte, el incremento al daño en el DNA, y un incremento en la frecuencia de translocación de los cromosomas 7, 11 y 14 se ha demostrado en linfocitos de 10 pacientes con neurocisticercosis, que sugiere que una estimulación antigénica persistente en la neurocisticercosis puede causar inestabilidad cromosómica en los linfocitos [12], lo cual podría constituir un mecanismo adicional, a través del cual los helmintos pueden producir cáncer. Datos epidemiológicos indican una posible asociación entre cisticercosis y el riesgo para neoplasias y tumores cerebrales.

La teniosis y la cisticercosis son dos enfermedades en el ser humano causadas por el helminto *Taenia solium*. La teniosis se adquiere al consumir carne de cerdo infectada con la forma larvaria (cisticerco) del parásito que se establece en el intestino. La cisticercosis se genera por ingerir huevos del parásito en alimentos contaminados, la larva se aloja en el sistema nervioso central, músculo esquelético y ojo. El cisticerco es una forma intermedia o larvaria en el desarrollo de este parásito, la que sigue al embrión hexacanto (con seis ganchos), antes de convertirse en el gusano adulto o solitaria. Puesto que el humano es el único huésped definitivo natural de la *T. solium*, la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo (principal huésped intermediario). La *T. solium* o solitaria habita únicamente en el intestino delgado del ser humano. Su nombre común alude a que en la mayor parte de los casos se encuentra un solo gusano en cada portador; sin embargo, no es raro encontrar más de una solitaria en el mismo paciente [13].

El ciclo de vida de la *T. solium* se completa cuando el ser humano ingiere cisticercos vivos presentes en la carne cruda o insuficientemente cocida proveniente de un cerdo parasitado. Las enzimas gástricas e intestinales así como las sales biliares, participan en la

activación, ahora del cisticerco, induciendo la evaginación del escólex y su fijación en la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta [13]. En la figura 1, se muestra el ciclo de vida de la *Taenia solium* en donde el parásito alterna entre el ser humano como huésped definitivo y el cerdo como principal huésped intermediario. En su estado adulto (1), el parásito habita el intestino humano, infección conocida como teniasis. La tenia o solitaria produce miles de huevos, que se expulsan en la materia fecal. El cerdo se infecta al ingerir heces donde hay segmentos (proglótidos) (2) o huevos (3) del parásito adulto. Cada huevo tiene el potencial para convertirse en un cisticerco (forma larvaria) del parásito, ocasionando la cisticercosis porcina (4). La falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto, pueden ocasionar la ingestión de huevos, produciéndose la cisticercosis humana (5) [13].

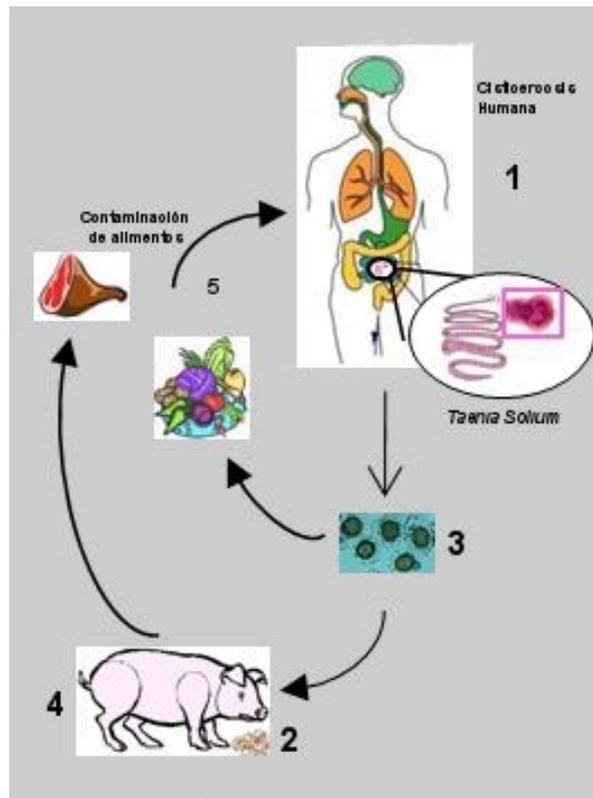


Fig. 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

Hasta hace pocos años la información sobre huésped-parásito en relación a teniasis se adquirió de pacientes en los cuales se prestó atención a los aspectos clínicos, diagnóstico, y tratamiento, especialmente los que estaban infectados con *Taenia saginata* [14].

2.4. Factor soluble secretado por el parásito

Un mecanismo adicional por el cual los parásitos pueden participar en la transformación maligna es la producción de moléculas con potencial genotóxico y carcinogénico. Se ha sugerido que para sobrevivir en un ambiente desfavorable y agresivo, los helmintos secretan varios factores que interactúan con las células del huésped, particularmente con las del sistema inmune, durante largos periodos. Es posible que algunas de estas moléculas modifiquen el genoma de las células del huésped incrementando el riesgo para una transformación maligna [15].

Para sobrevivir por largos periodos en condiciones adversas y en un ambiente agresivo, los helmintos secretan varios factores solubles que interactúan con las células del hospedero. Por lo tanto es posible que algunas de estas moléculas pudieran modificar la homeostasis de las células del hospedero e incrementar el riesgo de la transformación maligna. En un estudio se reportó que una molécula de RNA, secretada por el cisticerco de *Taenia solium*, tiene la capacidad de transformar morfológicamente a células embrionarias de hámster sirio (SHE) *in vitro*. Se ha encontrado que esta molécula induce daño genotóxico en cultivos de linfocitos humanos, lo que sugiere que este factor pudiera inducir inestabilidad genética en individuos infectados [12, 16, 17]. El mecanismo por el que esta molécula pudiera inducir daño genético y transformar las células de hospedero es desconocido; sin embargo una interacción directa entre el RNA y el DNA genómico pudiera estar relacionado con los efectos observados como se ha sugerido con otros RNA de bajo peso molecular, como U5 que son capaces de inducir aberraciones cromosómica y transformar células de ratón *in vitro*. El factor secretado por el parásito podría participar en la promoción y progresión tumoral [18].

2.5. La respuesta inmune ante la infección por helmintos

El sistema inmunitario es un mecanismo de defensa del organismo contra las infecciones. La función de las respuestas inmunitarias adquiridas es la eliminación de los microorganismos y las moléculas tóxicas producidas por ellos. Estas reacciones inmunitarias son destructivas, por lo que es importante que únicamente se produzcan contra las moléculas ajenas al huésped y no contra las propias. La habilidad de distinguir lo extraño de lo propio es una característica del sistema inmunitario adquirido [19,20].

Cualquier molécula capaz de inducir una respuesta inmunitaria adquirida se denomina antígeno (generador de anticuerpos). Gran parte del conocimiento actual sobre este tipo de respuesta deriva de estudios en los que se induce al sistema inmunitario adquirido de animales de laboratorio a que responda frente a moléculas extrañas inocuas, por ejemplo una determinada proteína. Esta estrategia implica la inyección de la molécula inocua junto con sustancias inmunoestimulantes denominadas adyuvantes que activarán el sistema inmunitario innato, este proceso se denomina inmunización [19,20].

Los linfocitos son células que llevan a cabo las respuestas inmunitarias adquiridas. Estas respuestas se engloban en dos grandes grupos: respuestas mediadas por anticuerpos (respuesta humoral) y respuestas mediadas por células (respuesta celular), son llevadas a cabo por diferentes clases de linfocitos, llamados linfocitos B y linfocitos T. En las respuestas humorales, los linfocitos B son activados para secretar anticuerpos, que son proteínas denominadas inmunoglobulinas. La unión del anticuerpo inactiva virus y toxinas ya que bloquea su capacidad de unión a receptores de las células huésped. La unión del anticuerpo también determina la destrucción de los patógenos, facilitando su ingestión por parte de las células fagocitarias del sistema inmunitario innato. En las respuestas inmunitarias mediadas por células, los linfocitos T activados reaccionan directamente contra un antígeno extraño que les presenta una célula en su superficie [19,20].

Los linfocitos sólo suelen reaccionar frente a antígenos extraños si el sistema inmunitario innato ha sido previamente activado. Dependen de receptores de

reconocimiento de patrón que reconocen patrones de moléculas asociadas a patógenos (inmunoestimulantes) como son DNA microbiano, lípidos, polisacáridos y proteínas de flagelos bacterianos, que están ausentes en el organismo huésped. Algunos de estos receptores se localizan en la superficie de células fagocitarias, como macrófagos y neutrófilos, donde favorecen la fagocitosis de los patógenos que, a continuación, serán conducidos a los lisosomas para ser eliminados. Otros receptores son secretados y se unen a la superficie de microorganismos y, de este modo, son eliminados por fagocitos o por el sistema del complemento [19,20].

Algunas de las células del sistema inmunitario innato presentan directamente los antígenos microbianos a los linfocitos T para iniciar la respuesta inmunitaria adquirida. Las células que llevan a cabo esta labor de modo más eficiente son las células dendríticas. Estas células fagocitan microorganismos o sus productos en el lugar de la infección y, a continuación, migran a los órganos linfoides periféricos próximos, donde actúan como células presentadoras de antígeno, activando directamente los linfocitos T. Algunos de estos linfocitos T activados migran al lugar de la infección, donde colaboran con otras células fagocitarias, fundamentalmente macrófagos, en la eliminación de los microorganismos. Otros linfocitos T permanecen en el órgano linfoide, donde ayudan a los linfocitos B en su respuesta frente a los antígenos microbianos. Los linfocitos B activados secretan anticuerpos que circulan por el organismo y se unen a patógenos, recubriéndolos y marcándolos para, de este modo, proceder a su posterior fagocitosis [19,20].

2.6. El papel de la calreticulina (CRT) en la infección

Los parásitos han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta del sistema inmune del hospedero. Estas estrategias incluyen la producción de varios antígenos, inhibición de las proteínas del hospedero, tales como los antígenos de histocompatibilidad. Los mecanismos por los cuales el parásito evade la respuesta inmune con frecuencia conducen a cambios inmunopatológicos, que pueden afectar a la vigilancia inmunológica, una condición que podría contribuir a la expansión clonal de las células transformadas [17].

La calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional altamente conservada que une calcio y que está presente en el retículo endoplásmico de todas las células de organismos superiores, a excepción de eritrocitos. Estudios de inmunolocalización mostraron que la expresión de CRT es espacial y temporalmente regulada durante la espermatogénesis y la embriogénesis. Además se encuentra en el tegumento, ganchos y róstelo, lo que sugiere la participación en el sitio de anclaje y en la alimentación a través del tegumento, por lo que, sugiere un papel importante en la relación hospedero-parásito. La CRT también se ha identificado en la superficie de células y en productos de excreción/secreción de algunos nemátodos y tremátodos, ya que se ha demostrado que induce una protección parcial en la vacunación por vía parenteral. Esta proteína es capaz de interactuar con el sistema inmune del hospedero, dado que se han detectado anticuerpos anti-calreticulina en pacientes con tripanosomiasis, esquistosomiasis y oncocercosis. CRT estimula linfocitos B y T, induce la producción de IL-4 e interactúa con el componente C1q del complemento. La CRT en la mucosa intestinal y en circulación podría inducir respuestas celulares, humorales o modulación de la misma [21,22].

2.7. La prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica como indicador de genotoxicidad

El concepto de genotoxicidad es un término que hace referencia al producirse algún tipo de alteración o daño en el material genético. Los ensayos de genotoxicidad están diseñados para detectar agentes genotóxicos que inducen daño genético de forma directa o indirecta, mediante diversos mecanismos. Este daño genotóxico (daño al DNA) es valorado mediante la realización de una batería estándar de ensayos *in vitro* o *in vivo*, esta batería estándar principalmente consiste de:

- a) Ensayos de mutación génica en bacterias.
- b) Estudios *in vitro* de mutaciones en mamíferos y/o ensayos para detectar daño cromosómico.
- c) Ensayos *in vivo* para detectar daño cromosómico.

Actualmente, el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en roedores, es una herramienta ampliamente utilizada para determinar el daño genético o detectar el efecto genotóxico producido por sustancias químicas [23,24]. La prueba de micronúcleos fue desarrollada por W. Schmid en 1975, quien originalmente la propuso para analizarse en la médula ósea de ratón, en la actualidad es una técnica utilizada en una gran variedad de tejidos y especies [25].

Los micronúcleos (MN), también conocidos en Hematología con el nombre de cuerpos de “Howell-Jolley”, se definen como estructuras cromatídicas presentes en el citoplasma, rodeadas de una membrana sin conexión aparente con el núcleo de la célula. El ensayo de micronúcleos permite evaluar la capacidad de un compuesto para inducir alteraciones cromosómicas, tanto de tipo estructural como numérico, ya que los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que espontáneamente o por causa de agentes que rompen cromosomas (agentes que se

denominan clastógenos) o que dañan el huso mitótico (agentes aneugénicos), quedan fuera del núcleo durante la mitosis. Estos cromosomas o fragmentos cromosómicos permanecen visibles en el citoplasma de la célula bajo la apariencia de un pequeño núcleo o “micronúcleo” [26].

La presencia de ácido ribonucleico (RNA) en el citoplasma de los eritrocitos recién formados hace que estos adopten una coloración roja al ser teñidos con el colorante naranja de acridina, siendo denominados eritrocitos policromáticos (PC) o también llamados reticulocitos (RET). La desaparición gradual del RNA hace que los eritrocitos más maduros no se tiñan, siendo denominados eritrocitos normocromáticos (NC) (Fig.2) [26].

El ensayo de MN en eritrocitos se fundamenta en la capacidad de la sustancia en estudio de inducir la formación de MN en los eritroblastos (células precursoras de los eritrocitos) de médula ósea, un linaje celular en constante proliferación y por lo tanto ideal para valorar la inducción de daño genotóxico por agentes clastógenos y aneunógenos. Al producirse la pérdida del núcleo celular después de la última división de los eritroblastos, la presencia de MN es fácilmente reconocible en los eritrocitos anucleados [26].

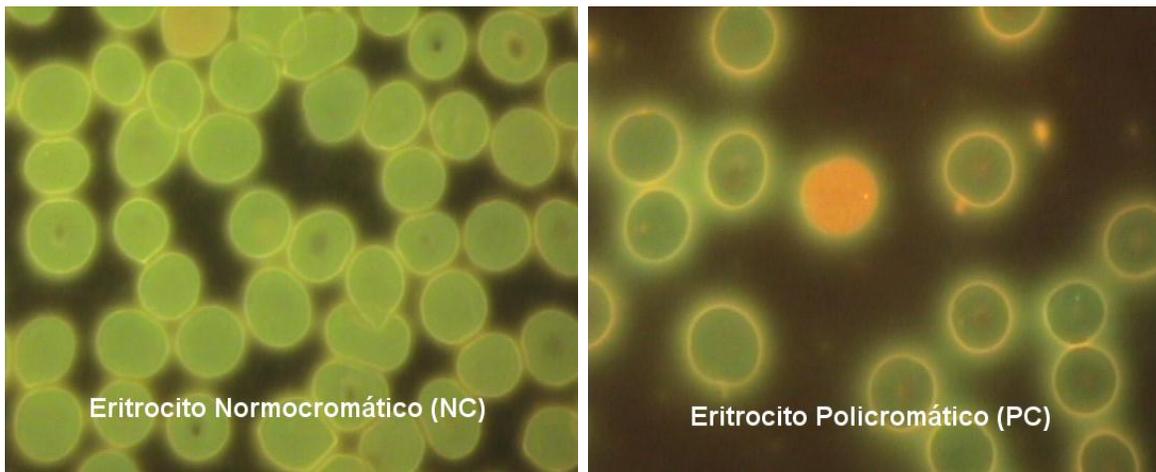


Fig. 2. Eritrocito normocromático izquierda y eritrocito policromático derecha

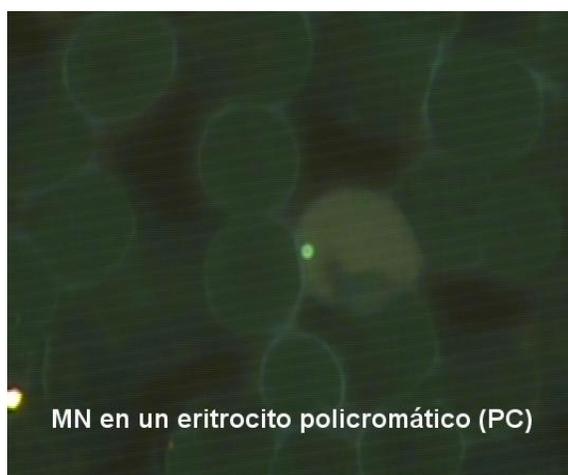


Fig. 3. Eritrocito policromático micronucleado

En la Tabla 1, se muestra la información obtenida de una revisión de la literatura publicada sobre la frecuencia de MN en eritrocitos policromáticos o reticulocitos (RET) en varias especies de roedores utilizados como controles en estudios de genotoxicidad. Los estudios reportados con la técnica de metanol-naranja de acridina, muestran que la frecuencia de MN es de 0.027-0.3 MN/1000 RET.

Tabla 1. Porcentaje de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de roedores utilizando el método metanol-naranja de acridina.

$\bar{x} \pm d.e/1000$ cel (MN-RET)	Tipo	Vehículo/ Ruta	Especie/ Edad	Obtención de la muestra	Referencia
0.293 ± 0.058	MN/PC	Agua (oral)	Ratones B6C3F1 8-16 semanas	vena cola	Witt et al, 2008
0.027 ± 0.013	MN/PC	Agua (oral)	Ratas Fisher 344 8-16 semanas	vena cola	Witt et al, 2008
0.104 ± 0.028	MN/PC	Agua (oral)	Ratas Sprague- Dawley 6-7 semanas	vena cola	MacGregor et al 2006 [27]
0.2 ± 0.1 0.3 ± 0.1	MN/PC MN/PC	0.9% salina (ip) 0.5 % metilcelulosa- agua w/v (op)	Ratas Sprague- Dawley 7 semanas	vena cola	Torous et al, 2003
0.093 ± 0.002	MN/PC	Agua (oral)	Ratas Sprague- Dawley 7-8 semanas	vena cola	Dertinger et al, 2006 [28]

En cuanto al modelo del hámster para evaluar genotoxicidad solo se encontraron dos reportes en la literatura. Es interesante mencionar que estos estudios fueron realizados utilizando otras técnicas de tinción y que una de las investigaciones se realizó bajo condiciones experimentales y en médula ósea. Los reportes en hámsteres muestran que la frecuencia de MN varía de 0.063 a 0.283 (Tabla 2).

Tabla 2. Reportes en la literatura que evalúan micronúcleos en hámsters

$\bar{x} \pm d.e./1000$ cel (MN-RET)	Tipo	Especie/ Edad	No. De animales	Vehículo/ Ruta	Muestra	Método	Frecuencia
0.063 ± 0.01	MN/ PC MN/ NC	Hámsters de zoológico Edad no reportada	11	NINGUNO	Sangre periférica	Wright- Giemsa	Zúñiga et al, 1996 [29]
0.233 ± 0.04	MN/ PC	Hámsters Edad no reportada	10	DMSO (ip)	Médula Ósea	May- Grünwald- Giemsa	Fierdman et al, 1977 [30]

3. JUSTIFICACIÓN

La *Taenia solium* es un cestodo de importancia médica y veterinaria ya que puede parasitar tanto el ser humano como al cerdo. La teniosis se adquiere al consumir carne de cerdo infectada con la forma larvaria (cisticerco) del parásito que se establece en el intestino. Por otra, parte, la cisticercosis se genera por ingerir huevos del parásito en alimentos contaminados, la larva se aloja en el sistema nervioso central, músculo esquelético y ojo. Particularmente, la neurocisticercosis, es una enfermedad considerada como un problema de salud pública, asociada con neoplasias en el cerebro. Se ha reportado que un factor soluble secretado por *Taenia solium* induce daño genotóxico en cultivo de linfocitos humanos, por lo que considerando que el daño en el material genético podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer y que agentes como parásitos, particularmente helmintos, han sido asociados con el desarrollo de cáncer, es de interés conocer si la infección con *Taenia solium* produce genotoxicidad *in vivo* en el modelo experimental de teniosis en el hámster. Este tipo de roedor representa un excelente modelo de estudio para la teniosis, ya que es un hospedero permisivo, porque los cisticercos de la *T. solium* se pueden desarrollar a la edad adulta en el intestino delgado de estos animales.

A partir de lo anteriormente descrito, también se ha planteado que la calreticulina juega un papel importante en los procesos de anclaje de la *T. solium* a la pared intestinal, lo que sugiere que tiene un papel importante en la relación hospedero-parasito a nivel de la respuesta inmune. Además, la vacunación vía oral con calreticulina ha mostrado tener un efecto protector contra el desarrollo del parásito en el modelo de teniosis en el hámster. De ahí que resulte interesante tratar de conocer el efecto que tiene la calreticulina en la frecuencia de micronúcleos en este modelo.

4. HIPÓTESIS

Dado que un factor soluble, con capacidad genotóxica, secretado por *Taenia solium* induce daño genotóxico en cultivo de linfocitos humanos, entonces la frecuencia de micronúcleos se incrementará en los hámsteres infectados con *Taenia solium*, este daño generado por el parásito disminuirá bajo condiciones de inmunización con la calreticulina, la cual ha mostrado un efecto protector sobre la infección con el helminto.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico producido por la infección con *Taenia solium* y por la calreticulina en el modelo experimental de teniosis en hámster, mediante la evaluación de las frecuencias de micronúcleos en sangre periférica.

Objetivos específicos

Evaluar la influencia de la edad en la frecuencia basal de micronúcleos en hámsteres machos de 3 y 9 meses de edad utilizando la técnica de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica obtenida de la vena retro-orbital.

Evaluar la genotoxicidad en hámsteres infectados durante diferentes tiempos con *Taenia solium*, mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica obtenida de la vena retro-orbital.

Evaluar el efecto de la inmunización con calreticulina en la inducción de micronúcleos en el modelo de teniasis en el hámster utilizando la prueba de micronúcleos en sangre periférica obtenida de la vena retro-orbital

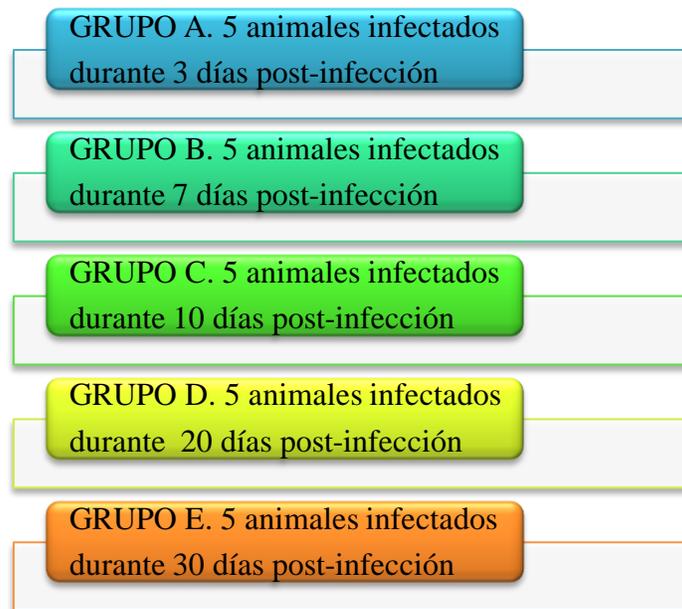
6. MÉTODO

6.1 Infección con *Taenia solium* e inmunizaciones

Los protocolos de infección y de inmunización de los hámsteres se realizaron de acuerdo a la colaboración establecida con el grupo de investigación de la Dra. Ana Flisser de la Facultad de Medicina. Los animales fueron criados y alimentados de acuerdo a León *et al.*, 2009.

6.2. Infección con *Taenia solium*

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena retro-orbital, en la cual se evaluó la frecuencia basal de micronúcleos. Se infectaron a 25 animales por vía oral con 4 cisticercos cada uno, posteriormente los animales se dividieron en grupos de 5 animales [21]:

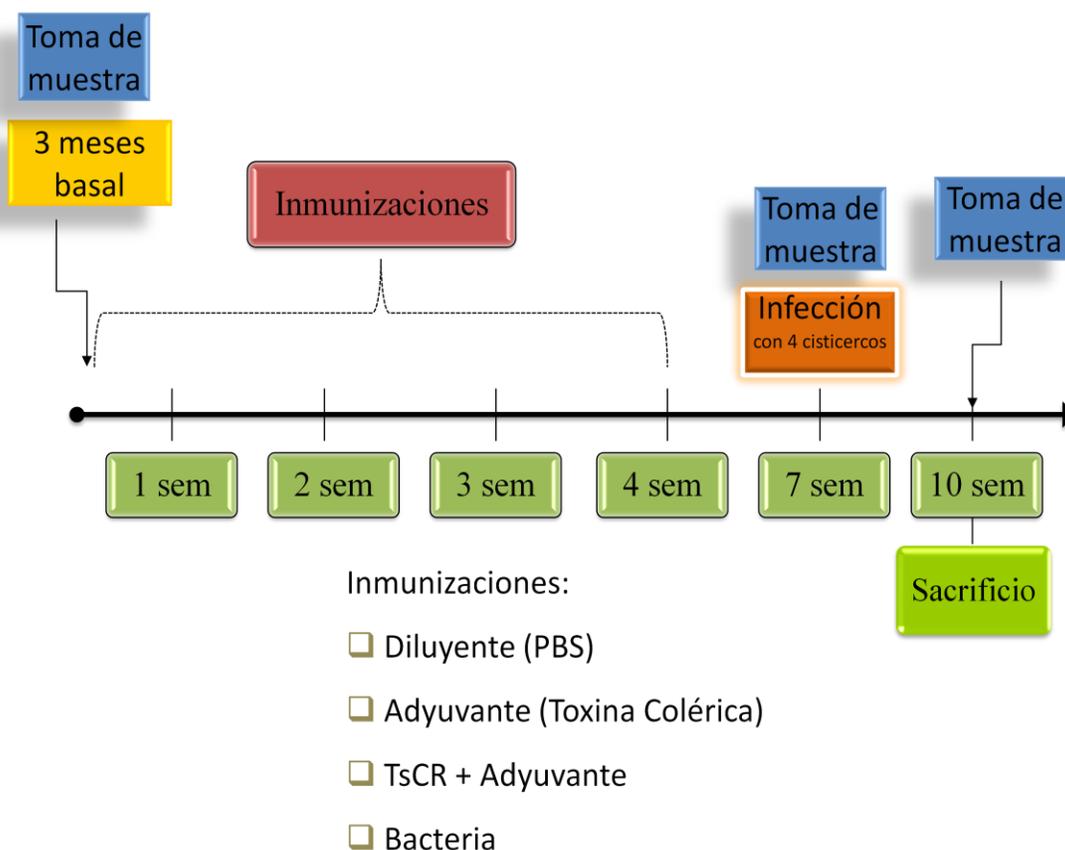


Al término de la infección se obtuvieron muestras de sangre de la vena retro-orbital, en la cual se evaluó la genotoxicidad producida por *Taenia solium*, mediante la prueba de micronúcleos.

6.3. Inmunización e infección.

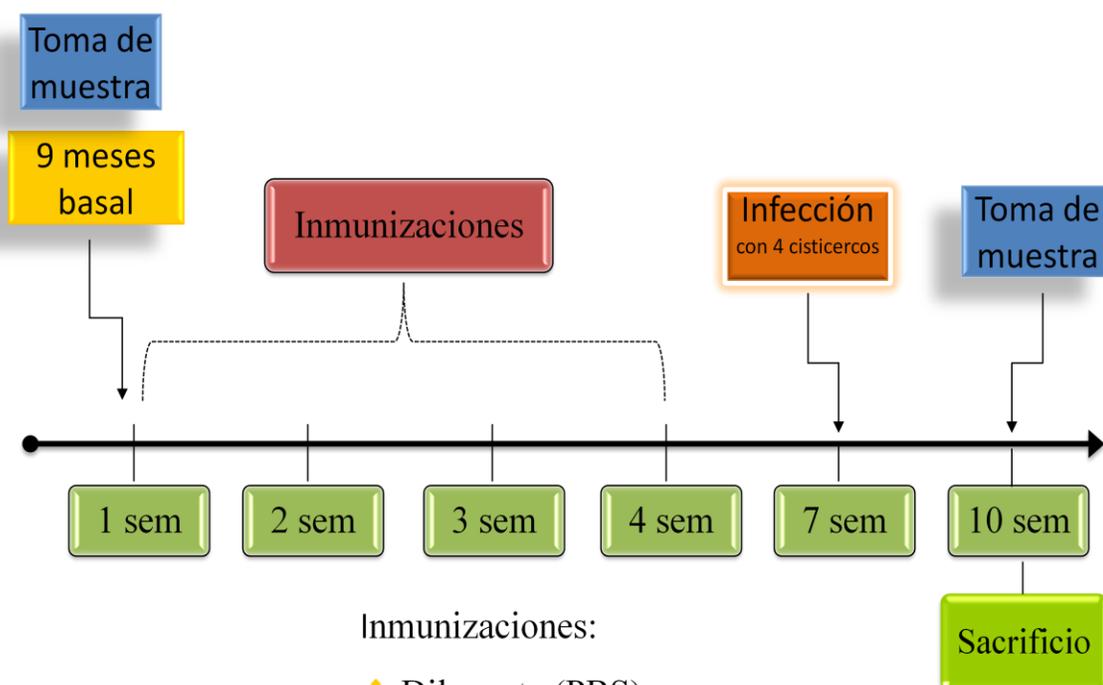
a) Hámsteres 3 meses de edad

Para evaluar el efecto de la calreticulina, se obtuvieron muestras de sangre antes y después de las inmunizaciones y al término de las dos semanas de infección con los cisticercos de *Taenia solium*, según el diagrama. Se evaluó al menos 5 animales para cada condición.



b) Hámsteres 9 meses de edad

Para evaluar el efecto de la calreticulina, se obtuvieron muestras de sangre al término de las dos semanas de infección con los cisticercos de *Taenia solium*, según el diagrama. Se evaluó al menos 5 animales para cada condición.



Inmunizaciones:

- ❖ Diluyente (PBS)
- ❖ Adyuvante (Toxina Colérica)
- ❖ TsCRT + Adyuvante
- ❖ TsCRT
- ❖ Bacteria

6.4. Obtención de la muestra de sangre

Las muestras de sangre periférica se tomaron por punción de la vena retro-orbital utilizando un capilar y se colocaron en tubos con heparina, previamente rotulados.

6.5. Evaluación de micronúcleos (MN) en eritrocitos de sangre periférica

Se colocaron 10 µl de sangre en un portaobjetos, bien limpio y desengrasado, previamente rotulado con una identificación del animal. Se tomó un segundo portaobjetos con el borde esmerilado, se colocó en un ángulo de aproximadamente 30° con respecto al porta horizontal y se dejó que éste tome contacto con la muestra de sangre. La sangre se distribuyó por capilaridad a lo largo del borde del portaobjetos extensor. El portaobjetos con el que se realizó la extensión se deslizó sin hacer demasiada presión y lo más perfectamente aplicado con su borde contra el portaobjeto horizontal, sobre el que se hace la extensión. Se dejó secar el frotis al aire libre. La preparación se fijó por 10 minutos en metanol absoluto y posteriormente se esperó a que el metanol se evapore. Este procedimiento fija las células sobre el portaobjetos.

Las laminillas se tiñeron con el colorante naranja de acridina. Se lavó la preparación con una solución de PBS, para quitar el exceso del colorante. Las laminillas se protegieron de la luz, para evitar la degradación del colorante. Las laminillas fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (Olympus XC-60) bajo el objetivo 100X. El colorante tiñe a los eritrocitos policromáticos o reticulocitos de un color rojo. Para el análisis se consideraron estrictamente los MN bien definidos y que cumplan los criterios establecidos para la evaluación de MN [26].

6.6. Vacunación

Hámsteres de 3 y 9 meses de edad, se dividieron en grupos, generalmente compuestos de 5 animales. Se llevaron a cabo cuatro inmunizaciones orales durante un mes, con 100 µg de TsCRT mezclado con 10 µg de TC como el adyuvante, 100 µg sólo de TsCRT, 10 µg sólo de TC adyuvante, 100 µg de Bacteria (BL-21 no transfectadas). Veinte días después de la última inmunización, los hámsteres fueron infectados con cuatro cisticercos de *Taenia solium* y veinte días después los hámsteres fueron sacrificados.

6.7. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados a través del programa GraphPad Prism Version 5.01 y se expresaron como medias \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm d.e$). Para determinar si los datos son significativamente distintos se aplicó una prueba de análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) seguida de la prueba de Tukey.

7. RESULTADOS

Efecto de la edad en la frecuencia de micronúcleos

El análisis de la frecuencia basal de micronúcleos en los animales de 3 y 9 meses de edad, muestra que los animales de mayor edad tienen más micronúcleos que los hámsteres jóvenes. Los valores obtenidos para los hámsteres de 3 meses de edad fueron de 0.125%, mientras que para los hámsteres de 9 meses de edad fueron de 0.234%. Sin embargo, cabe mencionar que esta tendencia no mostró significancia estadística.

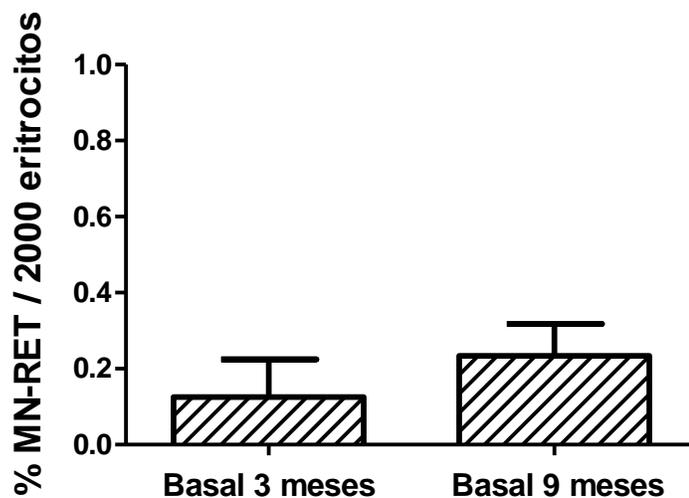


Fig. 4. Frecuencia basal de micronúcleos en hámsteres de 3 y 9 meses de edad

Tabla 3. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en hámsteres de 3 y 9 meses de edad

Animal	No. de Animales	Total de EPC ^a	$\bar{x} \pm d.e./1000$ cel (MN-RET)	$\bar{x} \pm d.e./1000$ cel (RET)
Hámsters ^b	16	34000	0.125 \pm 0.100	4.836 \pm 4.232
Hámsters ^c	17	34000	0.234 \pm 0.084	4.633 \pm 3.189

^a Total de eritrocitos policromáticos

^b Hámsteres de 3 meses

^c Hámsteres de 9 meses

Daño genotóxico producido por la infección con *Taenia solium*

Para evaluar el efecto genotóxico producido por la infección con *T. solium*, se analizó la frecuencia de micronúcleos en hámsteres infectados con cisticercos durante 3, 7, 10, 20 y 30 días. Los resultados indican que el parásito aumentó la frecuencia de micronúcleos de manera dependiente del tiempo de infección hasta los 20 días, mostrando una significancia estadística a este tiempo. Se encontró que a los 30 días de infección, la frecuencia de micronúcleos disminuyó (Figura 5 y Tabla 4). No se encontraron diferencias en la relación de eritrocitos policromáticos y normocromáticos (PC:NC), lo que indica que no hubo un efecto de toxicidad a nivel de médula oséa.

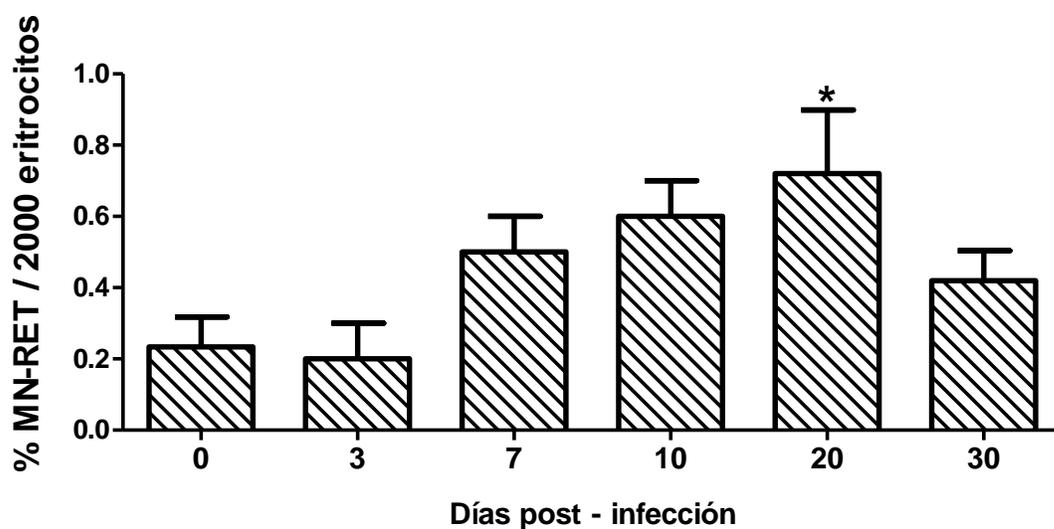


Fig. 5. Frecuencia de micronúcleos en hámsteres infectados con *Taenia solium*. Diferencia significativa * $p < 0.05$ con respecto a 0 días post-infección

Tabla 4. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en hámsteres infectados con *T. solium*

Animal	No. De animales	Total de EPC ^a	$\bar{x} \pm d.e./1000$ cel (MN-RET)	$\bar{x} \pm d.e./1000$ cel (RET)	P
Hámsters 0 DPI	10	20000	2.300 \pm 1.340	0.019 \pm 0.009	-
Hámsters 3 DPI	5	10000	0.200 \pm 0.100	6.420 \pm 0.789	-
Hámsters 7 DPI	5	10000	0.500 \pm 0.100	6.580 \pm 0.804	-
Hámsters 10 DPI	5	10000	0.600 \pm 0.100	8.280 \pm 0.973	-
Hámsters 20 DPI	5	10000	0.720 \pm 0.179	10.440 \pm 0.924	0.05*
Hámsters 30 DPI	5	10000	0.420 \pm 0.084	9.080 \pm 0.867	-

^a Total de eritrocitos policromáticos.

* Diferencia significativa con respecto a 0 días post-infección

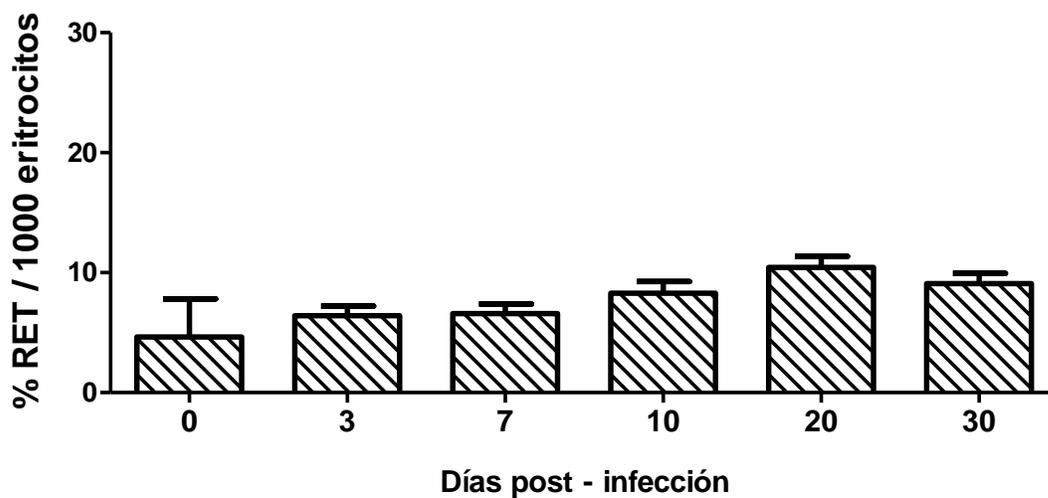


Fig. 6. Efecto de la infección con *Taenia solium* en la proporción de eritrocitos policromáticos % RET (PC:NC)

Efecto de la inmunización con calreticulina

Los datos sobre la evaluación del efecto de la inmunización con calreticulina en la inducción de micronúcleos en hámsteres de 3 meses, muestran que en los animales infectados hay un aumento de micronúcleos (diluyente) y disminuyen cuando los hámsteres son inmunizados con calreticulina y posteriormente infectados (Figura 7 y Tabla 5). Notablemente, en los hámsteres que fueron inmunizados con calreticulina (TsCRT+Adyuvante), disminuyó la frecuencia de micronúcleos con respecto al diluyente ($p < 0.05$), lo que sugiere un efecto protector por parte de la calreticulina. Asimismo, se observó un incremento en la frecuencia de micronúcleos en los hámsteres inmunizados con el adyuvante ($p < 0.05$, Figura 7).

Esto indica que el adyuvante administrado solo, causa daño genotóxico, pero no se observa toxicidad, ya que la relación de eritrocitos PC:NC, muestra un incremento de eritrocitos PC ($p < 0.05$) en los hámsteres que fueron inmunizados con adyuvante (Figura 8). También se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la frecuencia de micronúcleos en los hámsteres que fueron inmunizados con TsCRT+Adyuvante con respecto a los que fueron inmunizados con adyuvante. Esto indica que el efecto genotóxico inducido por el adyuvante puede ser inhibido por la calreticulina.

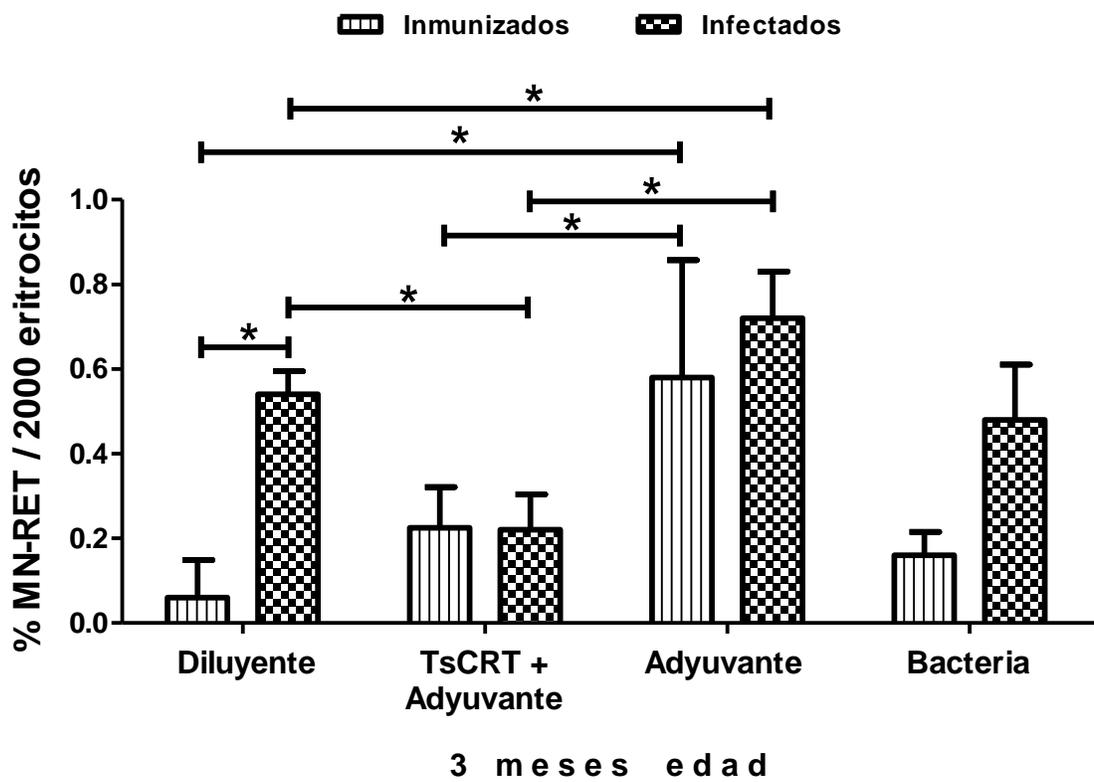


Fig. 7. Frecuencia de micronúcleos en hámsteres de 3 meses de edad inmunizados e infectados. Diferencia significativa * $p < 0.05$ con respecto al diluyente

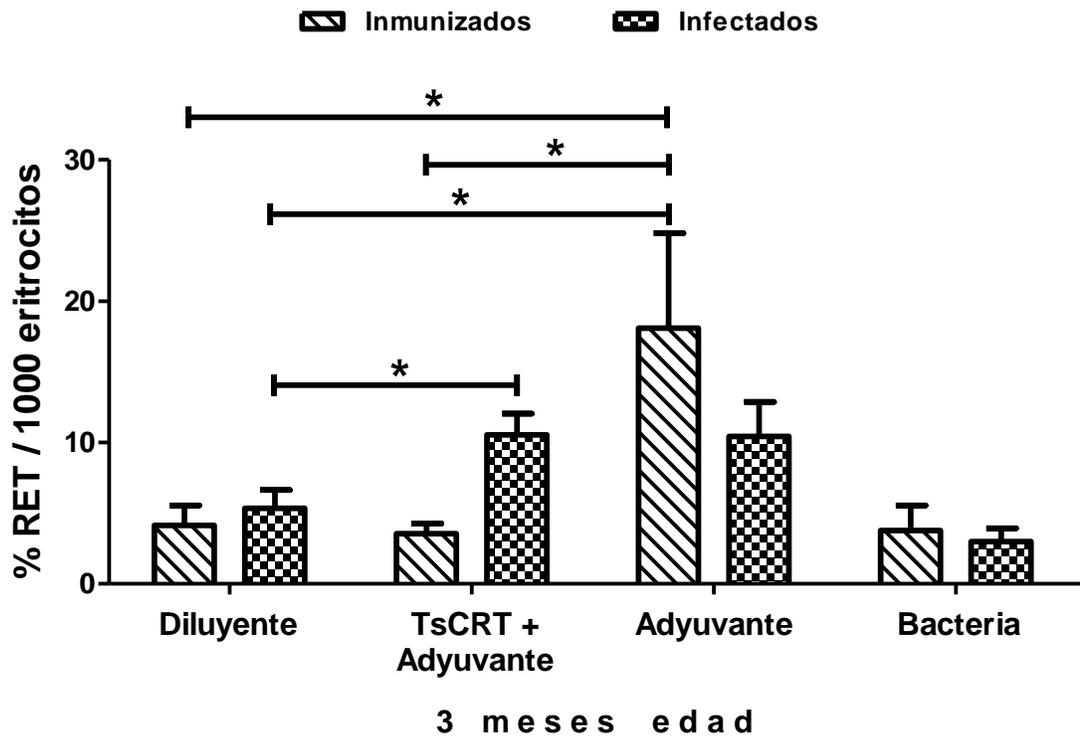


Fig. 8. Efecto de las inmunizaciones en la proporción de eritrocitos policromáticos PC:NC. Diferencia significativa * $p < 0.05$ con respecto al diluyente

Tabla 5. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en hámsteres inmunizados

Inmunización	No. De animales	Total de EPC ^a	$\bar{x} \pm d.e./1000 \text{ cel}$ (MN-RET)	$\bar{x} \pm d.e./1000 \text{ cel}$ (RET)	P
Diluyente	5	10000	0.600 ± 0.894	0.041 ± 0.014	-
TsCRT + Adyuvante	5	10000	2.250 ± 0.957	0.036 ± 0.007	-
Adyuvante	5	10000	5.800 ± 2.775	0.181 ± 0.067	0.005*
Bacteria	5	10000	1.600 ± 0.548	0.038 ± 0.018	-

^a Total de eritrocitos policromáticos

* Diferencia significativa con respecto al diluyente

Tabla 6. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en hámsteres infectados

Inmunización	No. De animales	Total de EPC ^a	$\bar{x} \pm d.e./1000 \text{ cel}$ (MN-RET)	$\bar{x} \pm d.e./1000 \text{ cel}$ (RET)	P
Diluyente	5	10000	0.540 ± 0.055	5.340 ± 1.297	-
TsCRT + Adyuvante	5	10000	0.220 ± 0.084	10.54 ± 1.506	0.005*
Adyuvante	5	10000	0.720 ± 0.110	10.42 ± 2.451	0.005*
Bacteria	5	10000	0.480 ± 0.130	2.980 ± 0.958	-

^a Total de eritrocitos policromáticos

* Diferencia significativa con respecto al diluyente

El efecto protector de la calreticulina no se observó en el protocolo de inmunización realizado con animales de 9 meses (Figura 9), probablemente a que la respuesta inmune de los animales adultos es menos eficiente.

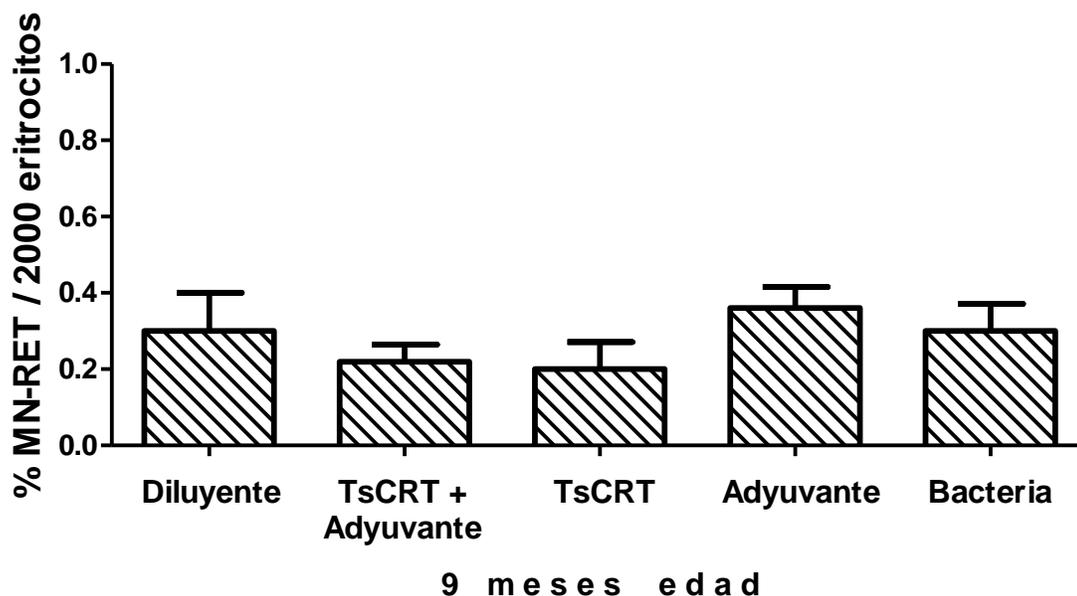


Fig. 9. Frecuencia de micronúcleos en hámsteres de 9 meses de edad infectados.

Tabla 7. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en hámsteres infectados

Inmunización	No. De animales	Total de EPC ^a	$\bar{x} \pm d.e./1000$ cel (MN-RET)	$\bar{x} \pm d.e./1000$ cel (RET)
Diluyente	5	10000	0.540 ± 0.055	5.340 ± 1.297
TsCRT + Adyuvante	5	10000	0.220 ± 0.084	10.54 ± 1.506
Adyuvante	5	10000	0.720 ± 0.110	10.42 ± 2.451
Bacteria	5	10000	0.480 ± 0.130	2.980 ± 0.958

^a Total de eritrocitos policromáticos

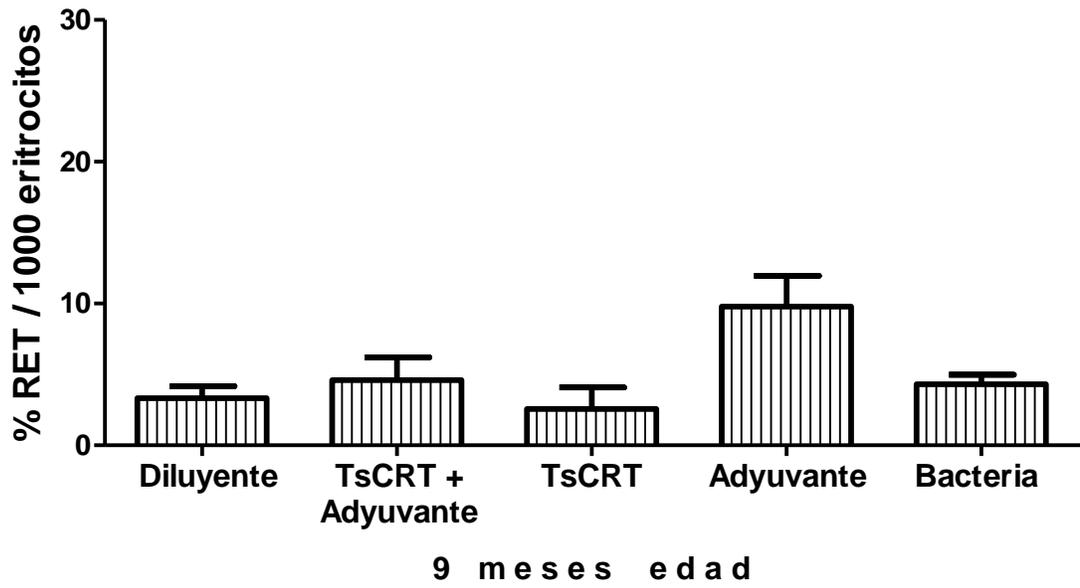


Fig. 10. Efecto de las inmunizaciones en la proporción de eritrocitos policromáticos PC:NC.

8. DISCUSIÓN

La frecuencia basal de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica depende en cada especie de roedores. Esto se debe a diferencias en la capacidad del sistema reticuloendotelial del bazo para eliminar las células dañadas (por ejemplo, eritrocitos micronucleados). Se conoce que el sistema reticuloendotelial en otras especies (perro y humano) es muy bueno en la eliminación de micronúcleos de la circulación. En el modelo de roedores, se ha observado que las ratas son más eficientes para eliminar micronúcleos de la circulación que los ratones. Con respecto a la frecuencia basal de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en el modelo del hámster, poca información ha sido encontrada en la literatura. En comparación con las frecuencias obtenidas en este estudio (0.125-0.234 %), estas difieren de las reportadas por Zúñiga et al, (0.063%), sin embargo, fueron similares a los datos reportados en otros roedores.

Se ha reportado que la frecuencia espontánea de micronúcleos en linfocitos humanos aumenta con la edad [31,32,33], pero es menos clara su influencia en el modelo de MN en eritrocitos en roedores, aunque se ha observado que ratones C57BL/6J de 32 semanas tienen más MN que los ratones de 6 y 16 semanas de edad cuando son tratados con 1Gy de radiación gamma [34]. En el presente estudio se encontró que la frecuencia de micronúcleos fue menor en los hámsteres más jóvenes (Figura 4), encontrando que los valores obtenidos en la frecuencia de micronúcleos (MN-RET) para los hámsteres de 3 meses de edad fueron de 0.125%, mientras que para los hámsteres de 9 meses de edad fueron de 0.234%, cabe mencionar que esta diferencia no mostró ser estadísticamente diferente.

En este trabajo se evaluó el efecto genotóxico producido por la infección con *Taenia solium*. Los resultados muestran que hay aumento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica dependiente del tiempo de infección hasta los 20 días de infección, el incremento a este tiempo de evaluación fue estadísticamente significativo (Figura. 5). En cuanto a la genotoxicidad, mientras que la relación hospedero-parásito en

humanos y cerdos con cisticercosis ha sido estudiada, poco se conoce en la relación con el parásito adulto de *T. solium*. Algunos reportes muestran una mayor frecuencia de daño genético en células de médula ósea y linfocitos de sangre periférica provenientes de pacientes infectados, en comparación a lo observado en donadores no infectados o individuos con tratamiento médico [12]. Estudios *in vitro* con líneas celulares y linfocitos humanos reportan daño genotóxico inducido por un factor soluble secretado por *Taenia solium* [16].

El conocimiento de los mecanismos por los cuales los parásitos inducen transformaciones malignas en las células del hospedero, permanece en debate, sin embargo, se plantea que la inflamación es una característica común de la helmintiasis, en el que las células inflamatorias generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que aparte de eliminar a los patógenos invasores, son capaces de inducir daño oxidante y daño al DNA, ya sea directamente o después de la interacción con otros radicales o componentes celulares[17]. Es importante destacar que los micronúcleos que son detectados en los eritrocitos son formados en la médula ósea, y estos eritrocitos dañados pasan a circulación y pueden ser detectados debido a la baja eficiencia del bazo de estos roedores para eliminar las células con daño, por lo que resulta interesante considerar la posibilidad de que el parásito esté produciendo algún factor con capacidad genotóxica [18].

Es notable que el daño genotóxico disminuye a los 30 días de la infección (Figura 5 y Tabla 4). Este decremento en la frecuencia de micronúcleos probablemente esté relacionado con acción inmunogénica del parásito. Estudios realizados con gerbos y hámsteres han mostrado que existe respuesta inmunológica ante la infección con *T. solium*, esta respuesta es caracterizada por una reacción inflamatoria en el sitio donde la tenia se implantó. Se ha observado que los eosinófilos se encuentran aumentados y localizados principalmente en la base de las vellosidades y que hay aumento en el número de células caliciformes en las vellosidades adyacentes, además, en la lámina propia están presentes linfocitos y células plasmáticas [35]. Interesantemente, se ha propuesto que la reacción inflamatoria que se desarrolla contra *T. solium* permite la expulsión del parásito en este roedor [36,35]. El análisis del perfil de citocinas presentes en la mucosa intestinal en el

modelo del hámster, muestra una expresión diferencial de mRNA para IFN- γ , IL-13, IL-4, IL-5 dependiendo del tiempo de infección con *T. solium*; en donde a las dos semanas de infección disminuye el número de animales positivos para IFN- γ , con lo que se genera una respuesta de tipo Th2. Por lo tanto, se sugiere que las tenias al inducir una respuesta Th1/Th2 con una polarización hacia Th2 influye en la expulsión de los gusanos [37]. León y colaboradores [21] encontraron que el porcentaje de recuperación de tenias en hámsteres de 2, 3, 4, 9 y 12 meses de edad, fue menor a los 30 días post-infección. Por lo tanto, posiblemente el decremento en la frecuencia de MN a los 30 días sea el reflejo de la expulsión del parásito que ha sido desencadenada en las dos primeras semanas, pero en circulación periférica, el daño (el cual fue originado a nivel de médula ósea) se puede detectar elevado hasta los 20 días de infección. En cuanto al efecto citotóxico de la infección, no se encontraron diferencias significativas en la relación de eritrocitos policromáticos y normocromáticos (el % de RET no mostró cambios significativos) durante los diferentes tiempos de infección con el parásito, lo que indica que no hubo un efecto a nivel de toxicidad en médula ósea.

Para evaluar el efecto de la inmunización oral con calreticulina (TsCRT) en la inducción de micronúcleos, se realizaron dos protocolos, uno con animales de 3 meses y otro con animales de 9 meses. Como se observa en la figura 7, los hámsteres de tres meses de edad, que fueron inmunizados con TsCRT+Adyuvante, disminuyó la frecuencia de micronúcleos con respecto al diluyente ($p < 0.05$), lo que indica un efecto protector por parte de la calreticulina en el modelo de teniosis en hámster. Se ha propuesto que la calreticulina (CRT) tiene un papel importante en la relación hospedero parásito, de ahí que participa en el sitio de anclaje del parásito. También se ha identificado en la superficie de células y en productos de excreción/secreción de algunos nemátodos y tremátodos [21,22]. También se ha mostrado que esta proteína es capaz de interactuar con el sistema inmune del hospedero, ya que se han encontrado anticuerpos anti-calreticulina en pacientes con tripanosomiasis, esquistosomiasis y oncocercosis [22]. Además, la CRT estimula linfocitos B y T. Recientemente se ha demostrado que la CRT induce una protección parcial contra la teniosis en la vacunación por vía parenteral [21]. Por lo tanto, es posible que la CRT (ya sea en la mucosa intestinal y/o en circulación) este induciendo respuestas celulares y humorales

que interfieren con el anclaje del parásito, esto se traduciría en un menor efecto genotóxico inducido por el parásito.

En muchas vacunas se añaden adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad y eficacia. En el presente trabajo, se utilizó a la toxina colérica (TC) como adyuvante. La TC es conocida como uno de los adyuvantes más potentes en la inducción de una respuesta inmunitaria y se conoce que puede elevar la respuesta humoral de anticuerpos IgA secretores. Es interesante mencionar que la administración del adyuvante produjo daño genotóxico, ya que la inmunización únicamente con TC produce una elevación de micronúcleos (diluyente o TsCRT vs adyuvante, $p < 0.05$). Este mismo efecto se observó en los animales inmunizados y que además fueron infectados. En estos hámsteres, el análisis de la relación de eritrocitos PC:NC esta modificado, de ahí que se observa un incremento en el porcentaje de reticulocitos ($p < 0.05$) en los hámsteres que fueron inmunizados con adyuvante, lo que sugiere que el adyuvante no tiene un efecto a nivel de toxicidad, e incluso podría tener un efecto inmunoestimulador en los animales inmunizados con TC.

Con respecto al efecto de la inmunización oral con calreticulina (TsCRT) en la inducción de micronúcleos, utilizando animales de 9 meses, se encontró que el efecto protector de la calreticulina fue menos evidente, probablemente a que la respuesta inmune de los animales adultos es menos eficiente. De hecho, en comparación con los animales más jóvenes, en los hámsteres de 9 meses se puede apreciar que el efecto en la inducción de micronúcleos tiende a ser similar, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 9 vs Figura 7). Es probable que este efecto se deba a que la respuesta inmune de los animales adultos viejos sea menos eficiente. En este contexto, se conoce que la capacidad del sistema inmunitario disminuye para combatir infecciones a medida que el organismo envejece. Datos en humanos, muestran que en el proceso de inmunosenescencia está involucrado el timo, un órgano linfoide primario, el cual se encarga del desarrollo y la maduración de las células T. Se plantea que dicho órgano declina con la edad, la pérdida de masa es acompañada de un decremento de la producción de linfocitos T. Esto podría incrementar el riesgo de enfermedades y puede hacer que las vacunas sean menos efectivas [20].

Finalmente, es importante señalar que este estudio permitió conocer la frecuencia de micronúcleos en el modelo del hámster utilizando el método metanol-naranja de acridina. Los resultados obtenidos muestran que el hámster, es un buen modelo *in vivo* para evaluar genotoxicidad.

9. CONCLUSIONES

La frecuencia basal de micronúcleos fue menor en los hámsteres de 3 meses de edad (más jóvenes) que en los de 9 meses.

La infección con *Taenia solium* produce daño genotóxico, de manera dependiente del tiempo de infección hasta los 20 días, sin embargo, el daño disminuyó a los 30 días de infección y se relaciona con una menor recuperación de tenias.

En los hámsteres de 3 meses, la inmunización con calreticulina (TsCRT+Adyuvante), generó una disminución del daño genotóxico producido por el parásito, posiblemente por el efecto protector de la calreticulina contra la infección.

En los hámsters de 9 meses de edad, el efecto protector de la vacunación con calreticulina fue menos evidente que en los roedores más jóvenes, probablemente porque la respuesta inmune de los animales adultos es menos eficiente.

El modelo del hámster mostró ser útil y sensible para estudios de genotoxicidad *in vivo*, ya que la eliminación deficiente de las células dañadas por el sistema reticuloendotelial de este roedor, permitió detectar micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Vennervald B.J, Polman K. Helminths and malignancy. *Parasite Immunology*. (2009) 31(11):686-696.
- [2]. Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: Established associations and new hypotheses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. (2009) 70(3):183-194.
- [3]. Khurana S, Dubey M.L, Malla N. Association of parasitic infections and cancers. *Indian Journal of Medical Microbiology*. (2005) 23(2):74-79.
- [4]. Bacelar A, Castro L.G, Cheto de Queiroz A, Café E. Association between prostate cancer and schistosomiasis in young patients: a case report and literature review. *Braz J Infect Dis*. (2007) 11(5):520-522.
- [5]. Andrade Z.A, Abreu W.N. Follicular lymphoma of the spleen in patients with hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. (1971) 20(2):237-243.
- [6]. Andrade D.R, Ishioka S, Camara L.H, Meira J.A. Association of hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni* and histiocytic lymphoma. *Arq Gastroenterol*. (1982) 19(2):77-80.
- [7]. Habib S.L, Said B, Awad A.T, Mostafa M.H, Shank R.C. Novel adenine adducts, N7-guanine-AFB1 adducts, and p53 mutations in patients with schistosomiasis and aflatoxin exposure. *Cancer Detection Prevention*. (2006) 30(6):491-498.
- [8]. Ishii A, Matsuoka H, Aji T, Ohta N, Arimoto S, Wataya Y, Hayatsu H. Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). *Mutation Research*. (1994) 305(2):273-281.

- [9]. Matsuoka H, Aji T, Ishii A, Arimoto S, Wataya Y & Hayatsu H. Reduced levels of mutagen processing potential in the *Schistosoma japonicum*-infected mouse liver. *Mutation Research*. (1989) 227(3):153-157.
- [10]. Arimoto S, Matsuoka H, Aji T, Ishii A, Wataya Y & Hayatsu H. Modified metabolism of a carcinogen, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2), by liver S9 from *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Mutation Research*. (1992) 282:177-182.
- [11]. Zhang R, Takahashi S, Orita S, Yoshida A, Maruyama H, Shirai T, Ohta N. p53 gene mutations in rectal cancer associated with schistosomiasis japonica in Chinese patients. *Cancer Letters*. (1998) 131(2):215-221.
- [12]. Herrera L.A, Rodríguez U, Gebhart E, Ostrosky W.P. Increased translocation frequency of chromosomes 7, 11 and 14 in lymphocytes from patients with neurocysticercosis. *Mutagenesis*. (2001) 16(6):495-497.
- [13]. Larralde C. Aline S.A. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. Secretaria de salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fondo de cultura económica. México. (2006) Pag 245.
- [14]. Ávila G, Teran N, Aguilar L, Maravilla P, Miranda P, Flisser A. Laboratory animal models for human *Taenia solium*. *Parasitol International* (2006) 99-103.
- [15]. Herrera L.A, Santiago P, Rojas G, Salazar PM, Tato P, Molinari JL, Schiffmann D, Ostrosky-Wegman P. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutation Research*. (1994) 1(305):223-228.
- [16]. Herrera L.A, Ramirez T, Rodríguez U, Corona T, Sotelo J, Lorenzo M, Ramos F, Verdorfer I, Gebhart E, Ostrosky-Wegman P. Possible association between *Taenia*

- Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. (2000) 94(1):61-65.
- [17]. Herrera L.A, Ostrosky Wegman P. Do helminths play a role in carcinogenesis?. *Trends in Parasitology*. (2001) 17(4):172-175.
- [18]. Herrera L.A, Tato P, Molinari L.J, Pérez E, Domínguez H, Ostrosky W.P. Induction of DNA damage in human lymphocytes treated with a soluble factor secreted by *Taenia solium*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement*. (2003) 1:79-83.
- [19]. Alberts Bruce, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter. 2004. *Biología molecular de la célula*. 4a ed. Ediciones Omega. Barcelona. Pag 1463.
- [20]. Kindt J.T, Goldsby A.R, Osborne A.B. 2007. *Inmunología de Kuby*. 6a ed. Ediciones McGraw-Hill. México. Pag 574.
- [21]. León S, Cruz M, Mendlovic F, Ávila G, Flisser A. Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination. *Methods*. (2009) 1-5.
- [22]. Ferreira V. et al. Parasite calreticulin: posible roles in the parasite/host interface. *Inmunologia*. (2002) 21(3):156-168.
- [23]. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer B.J, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot J.C, Pieters R, Kleiner J. *Methods of in vitro toxicology*. *Food and Chemical Toxicology*. (2002) 40:193-236.

- [24]. Ellinger-Ziegelbauer H, Aubrecht J, Kleinjans J.C, Ahr H.J. Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicology Letters*. (2009) 186:36-44.
- [25]. Torous D.K, Dertinger S.D, Hall N.E, Tometsko C.R. Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: a flow cytometric study. *Mutation Research*. (2000) 465:91-99.
- [26]. Witt K.L, Livanos E, Kissling G.E, Torous D.K, Caspary W, Tice R.R, Recio L. Comparison of flow cytometry and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals. *Mutation Research*. (2008) 649:101–113.
- [27]. MacGregor J. Bishop ME, McNamee JP, Hayashi M, Asano N, Wakata A, Nakajima M, Saito J, Aidoo A, Moore MM, Dertinger SD. Flow Cytometric Analysis of Micronuclei in Peripheral Blood Reticulocytes: II. An efficient Method of Monitoring Chromosomal Damage in the Rat. *Toxicological Sciences*. (2006) 94(1):92-107.
- [28]. Dertinger D. Bishop ME, McNamee J.P, Hayashi M, Suzuki T, Asano N, Nakajima M, Saito J, Moore M, Torous DK, Macgregor JT. Flow Cytometric Analysis of Micronuclei in Peripheral Blood. Reticulocytes: I. Intra and Interlaboratory Comparison whit Microscopic Scoring. *Toxicological Sciences*. (2006) 94(1):83-91.
- [29]. Zúñiga G, Torres Bugarín. O, Ramírez Muñoz M.P, Ramos A, Fanti Rodríguez E, Portilla E, García Martínez. D, Cantú J. M, Gallegos Arreola M.P, Sánchez Corona J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research*. (1996) 369:123-127.

- [30]. Friedman M.A, Staub J. Induction of micronuclei in mouse and hamster bone-marrow by chemical carcinogens. *Mutation Research*. (1977) 43(2):255-261.
- [31]. Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*. (1985) 147:29-36.
- [32]. Fenech M, Morley A. Kinetochores detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis*. (1989) 4:98-104.
- [33]. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin Y, Ceppi M, Chang W.P, Holland N, Kirsch-V. M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti M.P, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson L.R, Fucic A, Garcia L. O, Hrelia P, Krishnaja A. P, Lee T. K, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosseso P, Muller W. U, Odagiri Y, Scarfi M. R, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. (2001) 37:31-45.
- [34]. Dertinger D, Bemis J. C, Phonethepswath S, Tsai Y, Nowak I, Hyrien O, Palis J, Chen Y. Reticulocyte and micronucleated reticulocyte responses to gamma irradiation: effect of age. *Mutation Research*. (2009) 675(4):77-80.
- [35]. Ávila G, Aguilar L, Benitez S, Yopez M. L, Lavenat I, Flisser A. 2002. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *Parasitol International*. (2002) 32(10):1301-8.
- [36]. Merchant M. T, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *Parasitol International*. (1998) 84(4):681-685.

- [37]. Ávila G, Aguilar L, Romero V. M, García V. F, Flisser A. Cytokine response in the intestinal mucosa of hamsters infected with *Taenia solium*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*. New York Academy of Sciences. (2008) 1149:170-3.