



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA CALRETICULINA RECOMBINANTE DE
TAENIA SOLIUM DE REDUCIR LA GENOTOXICIDAD EN UN MODELO DE COLITIS
MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PERFILIEV MEJÍA MARIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BOIMÉDICAS, UNAM

DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., FEBRERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA CARLETICULINA RECOMBINANTE DE
TAENIA SOLIUM DE REDUCIR LA GENOTOXICIDAD EN UN MODELO DE COLITIS
MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PERFILIEV MEJÍA MARIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., FEBRERO, 2017

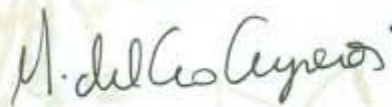
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PERFILIEV MEJÍA MARÍA** con número de cuenta **515046654**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA CALRETICULINA RECOMBINANTE DE TAENIA SOLIUM DE REDUCIR LA GENOTOXICIDAD EN UN MODELO DE COLITIS MURINO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH**:

Presidente: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
Vocal: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO
Secretario: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Suplente: DRA. FELA MENDLOVIC PASOL
Suplente: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de enero de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por aceptarme al programa del Posgrado y tener el privilegio de ser estudiante de esta Gran Universidad.

Al apoyo económico recibido por parte de CONACYT, el cual permitió dedicarme y esforzarme únicamente para este trabajo de investigación, gracias.

A la Dra. Ana Flisser, por aceptarme ser parte de su equipo profesional de este interesante proyecto de investigación, por la motivación y ejemplo en proponer las metas, alcanzarlas y compartir la experiencia profesional y humana que es necesaria para el trabajo en equipo y en la investigación. Gracias por darme esta oportunidad de crecer como investigadora, maestra y persona.

A la Dra. Ana María Salazar, por enseñarme a trabajar con una técnica especializada y estandarizada, por apoyar y guiar mi trabajo de investigación y tener abiertas las puertas de su Laboratorio constantemente. Gracias por su tiempo invertido productivamente conmigo.

Al Dr. Edgar Zenteno, por guiar este trabajo con su opinión profesional, por la crítica oportuna y motivación de sacar más allá de este trabajo de investigación. Por la oportunidad de trabajar en su equipo de investigación para aprender sobre la técnica de citometría de flujo y siempre tener presentes las preguntas “por qué y “para qué”?. Gracias por compartir su experiencia.

Agradecimientos a título personal

Quiero expresar mi gran agradecimiento a la Dra. Fela Mendlovic Pasol, por su continuo estímulo, ayuda y dirección en la elaboración del presente proyecto de tesis de maestría desde su principio y hasta la final, por la continua disponibilidad conmigo, a todas horas, por los consejos constructivos y apoyo profesional. Por un gran ejemplo de ser investigadora y madre, por la paciencia y enseñanza desde las cosas sencillas, como guardar las muestras, hacer cálculos, pedir reactivos y hasta las cosas grandes, como diseñar un experimento, un protocolo y escribir la tesis. Gracias por no cansarte de enseñarme y compartir las experiencias propias conmigo.

A la Dra. Lourdes Andrea Arreaga, por la atención prestada durante las veces de urgencia y necesidad, por enseñarme a trabajar y experimentar la técnica de citometría de flujo profesionalmente y poder sacar lo mejor de los propósitos del trabajo como estandarización y obtención de los resultados. Gracias por la disponibilidad y enseñanza profesional.

A la Dra. Regina Dorinda Montero por la atención y sugerencias sobre el trabajo de investigación.

A los compañeros del Laboratorio de Inmunomodulación y Agentes Patógenos de la Facultad de Medicina por su presencia y amistad.

A la M. en C. Mayra Cruz Rivera, por los consejos, amistad y enseñanza sobre el trabajo en equipo.

Al Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla, por las explicaciones y sugerencias sobre el tema de trabajo de investigación y el aprendizaje a través de una crítica constructiva.

Al estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Dra. Ana María Salazar, Juan Pablo Pánico Molina, por la enseñanza de trabajar con el programa Flowjo, por compartir su experiencia sobre la técnica de citometría de flujo y la disponibilidad de tiempo y atención para este trabajo de investigación.

A la estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas Laura Díaz Álvarez, por apoyar y compartir los conocimientos propios conmigo para que este trabajo de investigación salga adelante. Gracias por la motivación.

A mi familia, mi esposo Dr. Javier César Mejía Gómez e hijos Mario y Sofía Mejía Perfiliev, por motivarme y apoyarme para que el proyecto salga exitoso. Por su paciencia y cariño y por hacerme sentir productiva y feliz. Gracias por estar a mi lado.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo de investigación a mi esposo y mejor amigo Dr.

Javier Cesar Mejia y a mis hijos Mario y Sofia Mejia Perfiliev

ÍNDICE

Lista de figuras y cuadros.....	i
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Modelo murino de colitis inducido por TNBS.....	3
Calreticulina.....	5
Genotoxicidad	7
Mecanismos de inducción de genotoxicidad	8
Biomarcadores de daño al DNA	9
Ciclo de vida de los eritrocitos y sus precursoras	12
Métodos de determinación de MN.....	14
1. Análisis de MN por microscopía de fluorescencia.....	14
2. Determinación de MN por la citometría de flujo	15
Objetivo General	17
Objetivos específicos.....	17
Antecedentes	18
Metodología.....	19
Inmunización con calreticulina recombinante de <i>Taenia solium</i> (rTsCRT) e inducción de colitis	19
Determinación clínica del grado de enfermedad.....	20
Análisis de MN por microscopía de fluorescencia	20
Determinación de MN mediante citometría de flujo.....	21

Algoritmo de interpretación de los datos por citometría de flujo	22
Resultados	25
Determinación de los MN por la técnica de microscopía de fluorescencia	25
Determinación de los MN por la técnica de citometría de flujo.....	26
Correlación de la frecuencia de MN con el índice de enfermedad	33
Discusión	35
Conclusiones	44
Literatura citada	45

Lista de figuras y cuadros

Cuadro 1. Frecuencia de MN-NC con las diferentes concentraciones de RNAsa.

Cuadro 2. Frecuencia de los MN-RET con concentraciones diferentes de PI.

Figura 1. Esquema de generación de ventanas para determinación de MN.

Figura 2. Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad en el modelo murino de colitis mediante microscopía de fluorescencia.

Figura 3. La relación entre el MFI positivo y negativo en la muestra teñida con diferentes concentraciones de anti-CD71-FITC.

Figura 4. Titulación del anticuerpo anti-CD71-FITC.

Figura 5. Dot plots de la tinción con Ioduro de propidio (PI) y RNAsa.

Figura 6. Dot plots de las muestras teñidas con anti-CD71-FITC, RNAsa y diferentes concentraciones de PI.

Figura 7. Frecuencia de MN en RET (genotoxicidad) y porcentaje de RET (citotoxicidad) por citometría de flujo.

Figura 8. Correlaciones entre el estado de salud/índice de enfermedad y frecuencia de MN evaluadas por las dos técnicas.

Resumen

La “Hipótesis de la Higiene” sugiere que exposición a los helmintos intestinales promueven un ambiente inmuno-regulador reduciendo las reacciones inflamatorias exacerbadas. Aunque hay hallazgos a favor de la terapia con los helmintos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, factores éticos, psicológicos y la posibilidad de que los parásitos invadan otros tejidos, previenen su uso común como un tratamiento. La identificación de proteínas de helmitos purificadas con capacidad inmunomoduladora representa una estrategia para inducir redes de inmunoregulación sin la necesidad de infectar con los parásitos. La calreticulina es una proteína multifuncional, se ha identificado en diferentes helmintos y en sus productos de excreción/secreción y se ha demostrado, entre otras funciones, un papel en la inmunomodulación de la respuesta inmune. La calreticulina de *Taenia solium* recombinante (rTsCRT) administrada oralmente en un modelo de teniosis experimental en hámsteres redujo el daño genotóxico causado por la tenia. En el presente proyecto se investigó la capacidad de la rTsCRT de reducir el daño genotóxico producido por el ácido sulfónico de trinibenceno (TNBS) en un modelo de colitis murino, además de confirmar que rTsCRT no es genotóxica. La detección del daño al DNA se estudió a través de la medición de frecuencia de micronúcleos (MN), que son biomarcadores del daño, mediante dos técnicas: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Ambas técnicas demostraron concordancia con los valores altos de MN obtenidos en los ratones tratados con TNBS. Además, se encontró que la rTsCRT no es genotóxica y su administración oral previene el daño al DNA, reflejado como la reducción de la frecuencia de MN en los ratones tratados con rTsCRT.

Abstract

The "hygiene hypothesis" suggests that exposure to intestinal helminths promotes an immuno-regulatory environment by reducing exacerbated inflammatory reactions. Although there are findings in favor of helminth therapy for the treatment of inflammatory diseases, some aspects may restrict its use, such as ethical and psychological factors, as well as the possibility that parasites might invade other tissues. The identification of purified helminth proteins with immunomodulatory capacity represents a strategy to induce immunoregulatory networks without the need of iatrogenic infection. Calreticulin is a multifunctional protein that had been identified in different helminths and in their excretion/secretion products. Among other functions, CRT has a role in immunomodulation, modifying the immune inflammatory response. Oral administration of recombinant *Taenia solium* calreticulin (rTsCRT) in an experimental model of teniosis, reduced the genotoxic damage caused by the tapeworm. In this project, we investigated the ability of rTsCRT to reduce the genotoxicity produced by administration of trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS), to induce colitis in a mice model. Detection of DNA damage was studied by measuring the frequency of micronuclei (MN) as biomarkers of damage by two different techniques: fluorescence microscopy and flow cytometry. We found a positive correlation between disease severity and the frequency of MN using both techniques; the highest values of MN were present in mice treated with TNBS. Furthermore, we showed that rTsCRT is not genotoxic and that oral administration of this protein confers protection against DNA damage, as reflected in the reduced frequency of MN in rTsCRT treated mice.

Introducción

Los estudios epidemiológicos en los últimos años han demostrado que en los países desarrollados hay un incremento en las enfermedades inflamatorias, como alergias y enfermedades inflamatorias intestinales (IBD, por sus siglas en inglés), comparado con los países en desarrollo (1). La “Hipótesis de la Higiene” sugiere que exposición a los helmintos intestinales promueven un ambiente inmuno-regulador reduciendo las reacciones inflamatorias exacerbadas (2). En modelos experimentales de colitis se ha demostrado que los helmintos intestinales o sus productos de excreción/secreción (E/S) reducen la inflamación caracterizada por la producción de citocinas proinflamatorias, aumentando la secreción de citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- β (3). Aunque hay hallazgos a favor de la terapia con helmintos como *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura* y *Ascaris lumbricoides* en las enfermedades inflamatorias como esclerosis múltiple (4), alergias (5) y IBD (6), existen factores que impiden su uso, incluyendo el factor ético. Los parásitos pueden invadir otros tejidos e influir en la motilidad gastrointestinal (7). Por otro lado, para un paciente es difícil; psicológicamente aceptar este tipo de tratamiento, por lo que la identificación de proteínas purificadas con capacidad inmunomoduladora representa una estrategia para inducir redes de inmunoregulación sin la necesidad de infectar con los parásitos para tratar trastornos inflamatorios.

Modelo murino de colitis inducido por TNBS

Las IBD que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, son producidas por un conjunto de trastornos crónicos, inmunológicos y ambientales que ocurren en el tracto digestivo. Es de interés estudiar las IBD ya que afectan a las masas de casi todas las edades, incluyendo la población pediátrica. Varios estudios demuestran que

los factores etiológicos de las IBD incluyen, la predisposición genética, anomalías inmunológicas como una respuesta autoinmune desregulada contra la microbiota intestinal y los factores ambientales como dieta, estilo de vida y estrés (8). El ácido sulfónico de trinibenceno (TNBS) es ampliamente utilizado en modelos experimentales de colitis en ratones, además, se sabe que es un agente genotóxico (9). El TNBS se aplica diluido en 50% de etanol, que rompe la barrera de la mucosa, de tal modo que permite que el TNBS penetre y haptenice las proteínas autólogas. La inflamación es una consecuencia de la hipersensibilidad provocada por la haptenización de las proteínas autólogas/microbiales convirtiéndolas en inmunogénicas (8). El modelo de colitis con TNBS simula la enfermedad de Crohn (10) con una respuesta proinflamatoria de tipo Th1, infiltración de linfocitos y neutrófilos, liberación de factores proinflamatorios como factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (INF)- γ , la IL-12, así como la activación de la enzima inducible que sintetiza el óxido nítrico (iNOS) (8, 11). El TNF- α tiene un papel primordial en el desarrollo de la inflamación (12, 13) ya que regula la expresión de las moléculas de adhesión y citocinas de las células endoteliales como MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercelular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, E-selectina, P-selectina (13, 14), que tienen un efecto en el aumento de la permeabilidad vascular y en la infiltración de los leucocitos como neutrófilos y macrófagos (9, 14). Además, en los sitios de inflamación intestinal se puede detectar una sobreexpresión de iNOS por prácticamente cualquier célula del tracto intestinal, regulada entre otros componentes por el factor de transcripción NF- κ B. Una vez estimulada, la enzima iNOS sintetiza grandes cantidades de óxido nítrico (NO) incrementando la posibilidad de que éste dañe el DNA (14, 15). El NO tiene un electrón libre, lo que lo convierte en un radical libre, que puede captar un superóxido

(O₂⁻) y producir un oxidante tóxico llamado peroxinitrato (ONOO⁻) (16), que es capaz de reaccionar directamente con el DNA causando rompimientos de la doble cadena resultando en la formación de micronúcleos (MN)(14, 17). En estudios donde se inducen colitis en modelos murinos con TNBS como en el de Du et al.,2011 (18) tratan de prevenir el desarrollo de la colitis inyectando previamente la proteína del parásito *Trichinella spiralis*. En el caso de Ruysers et al., 2010 (19) posteriormente aplican un tratamiento con proteínas de helminto *Schistosoma mansoni* vía intraperitoneal. Estos dos estudios demuestran que hay un decremento en la patología de la enfermedad y un aceleramiento en su curación en el segundo caso e incluso prevención de la colitis en el primero (al tratar previamente). Este fenómeno se explica en ambos casos a través de la inducción de la respuesta inmune Th2 con predominancia de las citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL- 13, y la inhibición de la respuesta proinflamatoria de tipo Th1 por parte de los productos de los helmintos. En nuestro estudio, se decidió tratar la colitis inducida por TNBS con la calreticulina recombinante de *Taenia solium* (rTsCRT), mediante la administración previa por vía oral, y con la finalidad de evaluar si se previene el daño al DNA mediante el tratamiento con la rTsCRT a pesar de la presencia de TNBS, un agente genotóxico (9).

Calreticulina

La calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional, ubicua y muy conservada, que se descubrió en el retículo sarcoplásmico de células de músculo esquelético de conejo y que tiene la capacidad de unir Ca²⁺ en 1974 (20), por lo que tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular pero también participa en el plegamiento correcto de las glicoproteínas (21). El análisis de la secuencia de amino ácidos de la CRT demostró que posee una estructura

conservada que consta de tres dominios: 1) Dominio N terminal, presenta secuencias de amino ácidos que le confieren función de chaperona y una secuencia señal que marca las proteínas que se transportan al retículo endoplásmico (RE); 2) Dominio P caracterizado por la riqueza del amino ácido prolina y presenta alta afinidad a Ca^{++} . Contiene un sitio que le confiere función de lectina permitiendo interactuar con glicoproteínas y es necesario para su función de chaperona involucrada en el correcto plegamiento de las mismas; 3) Dominio C que se encuentra en el extremo carboxilo terminal y tiene alta capacidad de unión a Ca^{2+} . La CRT se ubica en el lumen del RE donde participa en el plegamiento correcto de las glicoproteínas y regula la homeostasis de Ca^{2+} intracelular actuando como sensor de este ion. Además participa en secreción, expresión génica, diferenciación, síntesis de proteínas y organogénesis (22, 23). En los últimos años, la CRT se ha identificado en diferentes helmintos y en sus productos E/S (24, 25). También, se ha demostrado que la CRT puede tener propiedades inmunomoduladoras. Por ejemplo, la CRT del nemátodo *Heligmosomoides polygyrus*, está presente en los productos de E/S e y se ha demostrado que induce una respuesta Th2, acompañada de la producción de las citocinas IL-4 e IL-10, en ratones infectados, sugiriendo que posee función de inmunomodulación (25). Además de su función como proteína anti-inflamatoria, la CRT ha demostrado propiedades de antioxidante. De acuerdo con la información descrita en el artículo de Xiang et al., 2015 (26) donde inducen estrés oxidativo mediante el uso de una solución hipertónica en el modelo de planta tabaco que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño oxidativo, la sobreexpresión de la CRT confiere tolerancia contra la producción de los ROS (26). La CRT de tabaco posee los tres dominios conocidos de ésta, así como la función en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular y en el plegamiento de las

glicoproteínas como todas las CRT estudiadas en mamíferos. Los autores demuestran que hay una relación entre la sobreexpresión de CRT, que incrementa el nivel de Ca^{2+} intracelular, desencadenando una cascada de señalización y la activación de la expresión de genes como el de la cinasa de calcineurina B (*CIPK* genes), que a su vez regulan la actividad de enzimas antioxidantes como dimutasa de superóxido (SOD), una de las enzimas que cataliza los ROS y previene el estrés oxidativo (26). Este estudio sugiere que la secuencia genética de la CRT, constituida por los tres dominios y su función en la homeostasis del Ca^{2+} , tienen un papel relacionado, entre otras funciones, con el mecanismo que podría tener esta proteína en el proceso de antioxidación.

Genotoxicidad

La genotoxicidad es un daño genético que sugiere la presencia de aberraciones cromosómicas y mutaciones genéticas en la célula y su evaluación tiene gran importancia para la salud humana por su asociación con cáncer y enfermedades crónicas degenerativas (27). Síndromes de inestabilidad cromosómica son el resultado de aberraciones a nivel de DNA como: deleciones, translocaciones e inversiones. Por ejemplo, la translocación entre los loci de los cromosomas 14 y 18 conducen a la sobreexpresión de la proteína BCL2 que inhibe la apoptosis de las células germinales, incrementa la proliferación y la sobrevivencia celular resultando en linfoma folicular (28). Las aberraciones cromosómicas sirven como biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer, así como de enfermedades crónicas degenerativas como artritis reumatoide (29). Otro tipo de biomarcador son los micronúcleos (MN), que son fragmentos de DNA de los cromosomas o cromosomas completos que no se unieron al huso acromático y pueden ser detectadas a través de varias tinciones

como con la naranja de acridina. Estos fragmentos de DNA provienen de un daño producido por un agente exógeno como radiación o agente endógeno, como fallas en el mecanismo de reparación de DNA (30).

Mecanismos de inducción de genotoxicidad

Un agente genotóxico es aquel que capaz de lesionar la integridad del material genético y/o sus componentes asociados. El daño producido al DNA que conlleva a una mutación puede ser directo, por ejemplo, la intercalación del agente tóxico en las hebras del DNA o indirecto, a través de la secreción de las citocinas proinflamatorias que generan un aumento de radicales libres no controlado que daña el DNA. Una mutación es un cambio permanente y heredable al nivel de DNA. Existen varios tipos de mutaciones: i) mutaciones espontáneas que se generan por agentes propios del organismo como errores en la replicación, alteraciones en el DNA que provienen de los metabolitos celulares, como la oxidación de los ácidos grasos o fosforilación oxidativa en la mitocondria (30, 31); ii) mutaciones inducidas por agentes físicos, químicos y biológicos, por ejemplo agentes alquilantes como el N-nitrosodimetilamino, agente químico que genera por el consumo de alimentos o cigarro y que se intercala en el DNA, en el enlace de las bases nitrogenadas y la desoxirribosa formando enlaces covalentes con el DNA conduciendo a la formación de un sitio apirimidínico o apurínico que se llama sitio AP. La inserción no correcta de una base en este sitio conduce a una mutación (32);. iii) mutaciones teratogénicas que es cuando el daño se produce durante la embriogénesis y afecta el tejido que se forma a partir de la célula mutada(30); iv) mutaciones heredables a la descendencia que ocurren en los gametos: óvulos o espermatozoides, como por ejemplo fibrosis quística y enfermedad de Tay-Sachs (33).

Biomarcadores de daño al DNA

Las alteraciones de DNA pueden ser detectadas mediante varios marcadores como, aberraciones cromosomales en metafase, que incluyen inter/intra cambios del material genético del mismo cromosoma, como el cromosoma dicéntrico (con dos centrómeros) o cambios numéricos de los cromosomas que conducen a las aneuploidias incluyendo monosomías, trisomías etc. Se evalúan las aberraciones después de la primera división mitótica para que no se reduzca el efecto del tratamiento a través del tiempo. Se requiere una tinción específica para poder identificar partes faltantes o duplicadas del cromosoma y no confundir el tamaño pequeño del cromosoma con un material perdido de otro. Esta técnica tiene el beneficio de que permite ver a nivel cromosómico los cambios en el número de cromosomas o las translocaciones y deleciones dentro del mismo cromosoma, pero es limitada porque se requiere del conocimiento previo del cariotipo, es una técnica laboriosa y demanda tiempo y experiencia, además el daño se detecta a través de una tinción y las partes no teñidas no se reconocen, por eso hay que tener suficiente información genética sobre este tipo celular (30).

Existe otro método, el ensayo cometa, el cual se basa en la medición de la longitud de la cola de DNA. En esta técnica se mezclan las células en agarosa derretida, se colocan en una laminilla que también está cubierta con agarosa y se incuban en una solución alcalina de lisis para disociar de DNA y destruir el RNA. Se someten a electroforesis donde el DNA migra, dejando una cola en forma de cometa, que posteriormente se tiñe con el bromuro de etidio y se mide su longitud en un microscopio de fluorescencia (33). Entre mayor daño genotóxico, la cola es más larga.

Adicionalmente existe la determinación de micronúcleos (MN) como biomarcadores del daño genético. Los MN son fragmentos de DNA o de cromosomas completos que provienen de la falta de unión al huso mitótico (acromático) en metafase/anafase como resultado de un proceso de división celular aberrante. Cuando ocurre una ruptura en el DNA en uno o dos puntos por un agente genotóxico y no hay una reparación adecuada, este fragmento se pierde en la siguiente división celular. Existen dos mecanismos dependiendo del daño producido al DNA, por los cuales se forman los MN durante la división celular: 1) Pérdida mitótica de fragmentos acéntricos en donde cualquier fragmento que no posee centrómero no se incorpora al núcleo por falta de su unión al huso mitótico. Posteriormente los cromosomas normales completos se incorporan en los núcleos de las células hijas y los fragmentos rezagados quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y se convierten en los MN. 2) Pérdida mitótica de cromosomas completos, cuando se daña el funcionamiento del aparato mitótico de tal modo que hay una pérdida de un cromosoma completo que da origen a MN más grandes debido al tamaño del cromosoma (34). Además del daño del DNA que se refleja en la formación de MN, el tamaño de éstos da información sobre el tipo de agente genotóxico. Existen agentes genotóxicos clastogénicos, como radiaciones ionizantes incluyendo rayos X, gamma y alfa, donde se daña el DNA del cromosoma de manera directa, que pueden interferir en la síntesis de DNA provocando lesiones (30) y agentes aneuploidogénicos, como por ejemplo el uso de colchicina, que afecta el huso acromático de tal manera que hay una pérdida total de un cromosoma completo y el MN causado por un agente aneuploidogénico se observa más grande (34, 35). Se pueden diferenciar uno de otro por la presencia de centrómero/cinetocoro mediante la técnica de FISH (fluorescence in situ hybridization, por sus siglas en inglés) donde se utilizan unas secuencias de

DNA fluorescentes que hibridan con las secuencias complementarias del cromosoma tiñéndolo y se puede analizar por microscopía de fluorescencia. Los MN producidos por el agente clastogénico no tiene el cinetocoro en contraste con los MN inducidos por el agente aneuploidogénico (36).

Los MN pueden ser detectados con técnicas *in vitro* e *in vivo*. El análisis *in vitro* requiere que las células se expongan a un agente tóxico, en la mayoría de los casos se usan linfocitos, pero se puede utilizar las células epiteliales de la mucosa bucal o de la piel. Se utiliza citocalasina B que bloquea la citoquinesis y las células se quedan en metafase, resultando en la formación de células binucleadas o multinucleadas. Se hace un conteo de 1000 células binucleadas mediante un microscopio de luz (37). Este tipo de ensayo es muy simple y rápido, evitando la invasividad a los tejidos interiores como la médula ósea para adquirir una muestra y sirve para evaluar diferentes dosis o varios agentes genotóxicos. Se puede medir en los siguientes tejidos: linfocitos, hepatocitos, en células de mucosa bucal, en eritrocitos de médula ósea y en sangre periférica (27, 38, 39)

La prueba de MN *in vivo* en eritrocitos de sangre periférica es un método ampliamente usado por su simplicidad. Los modelos más comunes son los roedores que incluyen los hámsteres, ratas y ratones además se usa la sangre de los seres humanos (38, 40, 41), pero también se puede utilizar modelo experimental de gato, peces y raíz de las plantas (27, 42-44). El ratón representa un buen modelo para medir el daño genotóxico a través de MN porque no elimina de manera tan rápida los eritrocitos micronucleados comparado con las ratas o el humano (38, 45). La frecuencia de RET en la sangre periférica es de 0.5 %-2.5 % en el humano (46) y de 1-3% en el ratón (47) del total de la masa eritrocítica circulante.

En nuestro trabajo se decidió trabajar con el biomarcador de MN por varias razones:

1. Su reconocimiento es muy simple, que se hace a través de una sola tinción. 2. No hay necesidad de bloquear metafase celular. 3. El propósito de nuestro estudio fue evaluar el efecto protector de una proteína con propiedades antiinflamatorias que se refleja como una disminución del biomarcador genotóxico, por lo que evaluar la frecuencia de MN en reticulocitos de sangre periférica es una herramienta que facilita este propósito.

Ciclo de vida de los eritrocitos y sus precursoras

Para entender el origen de los MN en los eritrocitos/ reticulocitos es necesario entender el proceso de eritropoyesis. Los eritroblastos son los precursores nucleados de los eritrocitos que se encuentran en la médula ósea. Durante la primera semana de la producción de eritrocitos se forma la unidad formadora de eritrocitos (burst forming unit eritroid, BFU, por sus siglas en inglés) la cual se convierte después de una semana a un ramillete llamado UFC-E unidades formadoras de colonias eritroides, que con la maduración se convierten en los pronormoblastos. El pronormoblasto se presenta sólo en la médula ósea, produce las proteínas y enzimas necesarias para la captación de hierro, tienen núcleo y uno o dos nucléolos. Aproximadamente su duración en este estado es de 24 horas, después se convierte en un normoblasto basófilo. Ahí comienza la condensación de la cromatina, el nucléolo desaparece, la relación núcleo/citoplasma (N/C) disminuye 6:1 y se produce la síntesis de hemoglobina. Esta fase dura aproximadamente 24 horas. La siguiente fase de maduración del eritrocito es el normoblasto policromático, donde la relación N/C se reduce a 4:1, no hay presencia de nucléolo, se observa por la primera vez la tinción roja del citoplasma asociado a la presencia de hemoglobina. Policromático

significa afinidad por muchos colores. Aún hay presencia de ribosomas que aportan la basofilia pero cada vez hay una mayor acumulación de hemoglobina que da un color rojizo. Es el último estado en el que la célula puede pasar por el proceso de mitosis y dura 24 horas. El normoblasto policromático se convierte en un normoblasto ortocromático con un núcleo completamente condensado (picnótico), la célula no se puede dividir debido a la condensación máxima de la cromatina y sólo se presenta en la médula ósea. La producción de la hemoglobina continúa en los ribosomas restantes que utilizan RNA mensajero producido en los estados anteriores. Al final de este estado el núcleo se expulsa de las células. La célula desarrolla proyecciones similares a pseudópodos en los cuales queda el núcleo y posteriormente estas proyecciones se separan de la célula con el núcleo envuelto por la membrana celular. El núcleo extruido es fagocitado por los macrófagos esplénicos. Esta etapa dura 48 horas después de la cual aparece el eritrocito policromático o reticulocito (RET). Los RET ya no poseen núcleo, reside en la médula ósea aproximadamente 1 día y luego pasa a la sangre periférica donde circula y madura durante los siguientes dos días. Los ribosomas restantes aparecen como una malla de pequeños filamentos azules en cuando son teñidos con azul de metileno y sirven para la producción de hemoglobina. Finalmente, los RET se convierten en eritrocitos que circulan en forma de un disco bicóncavo y miden de 7 a 8 micras de diámetro. Los eritrocitos no se dividen, permanecen activos durante 80-120 días en los mamíferos, proveen oxígeno a los tejidos y su envejecimiento conduce a su eliminación por el bazo. Aproximadamente 1 % de eritrocitos muere cada día y se reemplaza (46).

Aún no se sabe la razón de por qué se queda en MN en el reticulocito/ eritrocito pero hay dos hipótesis que pueden explicar este fenómeno:

1. Se ha mencionado que los RET desarrollan proyecciones similares a pseudópodos envolviendo el núcleo principal del eritrocito que posteriormente se separa de la célula y es fagocitado por los macrófagos. En el momento en que la envoltura nuclear debe cubrir los fragmentos de DNA que son los MN, esto no sucede y los MN se quedan en el citoplasma como resultado del daño que se provocó en las etapas anteriores de la división celular (46).

2. El normoblasto ortocromático pierde el núcleo al pasar de la médula ósea al torrente circulatorio vía los poros del citoplasma endotelial donde el núcleo queda atrapado por su tamaño y los MN si pasan ya que son más pequeños (48).

Métodos de determinación de MN

1. Análisis de MN por microscopía de fluorescencia

En esta técnica se utilizan los reticulocitos (RET) de la médula ósea o sangre periférica, que son las células precursoras de los eritrocitos que contienen grandes cantidades de RNA y se hace un frotis de sangre fijado con metanol, tiñendo con naranja de acridina (AO) que interactúa con el material genético. El RNA en presencia de AO emite un color naranja y tiñe todos los RET, mientras que el DNA emite un color verde-amarillo y tiñe los MN. Mediante un microscopio de fluorescencia, se hace el conteo de MN en 1000 RET(35). Existe una producción basal de los MN que no se considera genotóxica ya que los MN provienen de la división mitótica de las células sanas (47). Sin embargo, cuando hay un aumento en los MN y su frecuencia rebasa el límite basal de su producción, es una indicación de genotoxicidad producida por algún agente tóxico. Además, se hace un conteo de RET en 2000 eritrocitos maduros o normocromáticos (NC) que refleja el parámetro de citotoxicidad, información sobre el estado fisiológico de la célula, refleja que las células se reproducen de manera

normal y no se eliminan por apoptosis. Es importante tener información de citotoxicidad para confirmar que el daño aberrante proviene del agente tóxico y no de otros factores como el pH u osmolidad (en ensayos *in vitro*) (30) o el estado de salud del hospedero (*in vivo*) previo al tratamiento. Al final hay que confirmar que el parámetro de citotoxicidad no sobrepase el nivel de genotoxicidad producido por la dosis introducida a las células/hospedero, de lo contrario la evaluación de genotoxicidad no será confiable y correcta ya que el daño se generó a través de factores independientes del tratamiento, de los factores interiores de modelo experimental, por ejemplo: en leucemia mieloide se produciría más eritrocitos por su escasez crónica en la sangre periférica. Esta técnica es muy práctica, poco invasiva, fácil y barata, además, el hecho de que se maneja *in vivo* permite evaluar el efecto general del agente genotóxico, incluyendo el metabolismo de éste. Aun así, es un método muy laborioso, consume mucho tiempo, requiere una tinción de la muestra muy clara, experiencia en el conteo ya que el conteo está limitado a 1000/2000 células en total. Por estas y otras razones han buscado alternativas para poder evaluar los MN de manera más automatizada y rápida y la citometría de flujo es una de ellas.

2. Determinación de MN por la citometría de flujo

En esta técnica se usa menos cantidad de sangre y se hace una tinción con anticuerpo anti-CD71, el cuál reconoce los RET dentro de toda la población de células en sangre, donde la mayoría son eritrocitos y los MN se tiñen con ioduro de propidio (PI) usando una RNAsa previamente para evitar el pegado de PI al RNA presente en los RET. El anticuerpo anti-CD71 reconoce al receptor de transferrina que se une al hierro para la síntesis de hemoglobina y se encuentra en cantidades altas en las

células eritropoyéticas inmaduras. El anticuerpo está acoplado al fluorocromo FITC y se excita con láser azul de 488 nm y emite en 520 nm, es decir que la fluorescencia de este fluorocromo se detecta en el fotomultiplicador de 520 nm. El ioduro de propidio también se excita con láser azul de 488 nm (luz visible de color azul) y emite en 620 nm. Existe una pequeña área donde se sobrelapan los espectros de emisión de los fluorocromos y se detectan erróneamente en los fotomultiplicadores de FITC y de PI, por lo que es indispensable hacer la compensación para asegurar que las señales reales de FITC y de PI sean detectadas y evitar que haya una detección de señal de PI en el detector, de FITC y viceversa. Las células teñidas se leen en un citómetro de flujo y se separan las poblaciones positivas y negativas. La población positiva a ambos marcadores, CD71 y PI nos da la frecuencia de los MN en los RET. De preferencia hay que llegar a 10,000 eventos de los RET dentro de la población total (47, 49). El uso de citometría de flujo tiene una ventaja muy clara, se pueden evaluar numerosos eventos/células en poco tiempo (segundos a minutos) sin la necesidad del conteo por el microscopio, lo que la hace una técnica más sensible y rápida, además ser un método reproducible.

Objetivos

Objetivo General

Determinar si la inmunización oral con rTsCRT reduce el daño genotóxico producido por TNBS en un modelo de colitis murino.

Objetivos específicos

1. Evaluar la frecuencia de MN en muestras de sangre periférica mediante el conteo de MN por microscopia de fluorescencia.
2. Estandarizar la técnica de citoemtría de flujo.
3. Evaluar la frecuencia de MN en muestras de sangre periférica mediante citometria de flujo.
4. Confirmar que el TNBS aumenta la frecuencia de MN.
5. Analizar si la rTsCRT induce formación de MN y si disminuye los MN que se elevan con el tratamiento de TNBS.
6. Comparar los resultados obtenidos del conteo de MN por microscopia de fluorescencia y citometría de flujo.
7. Verificar si existe la correlación entre el grado de enfermedad y el aumento en MN

Antecedentes

En nuestro laboratorio identificamos la CRT del céstodo *Taenia solium* (TsCRT), la clonamos y expresamos como proteína recombinante (rTsCRT) y demostramos que es capaz de unir Ca^{2+} en un ensayo *in vitro* (24). Además, demostramos que se expresa diferencialmente en todos los estados de maduración del parásito *T. Solium*, especialmente durante la gametogénesis y embriogénesis, sugiriendo su función en esos procesos, y que forma parte de los productos de E/S de este helminto (23). Adicionalmente, la rTsCRT administrada oralmente en un modelo de ratón (50) y en hámster (51) fue capaz de inducir una respuesta inmune de tipo Th2 caracterizada por la inducción de IL-10 e IL-4, confirmando su función en inmunomodulación. Estos hallazgos sugieren el uso de la rTsCRT como una proteína inmunomoduladora con un potencial para disminuir la inflamación en enfermedades de etiología inflamatorias. A pesar de los trabajos previos se sabe poco sobre los efectos secundarios como el daño al DNA que podría producir la rTsCRT. En el modelo de teniosis experimental en hámsteres (40), administración oral de la rTsCRT redujo el daño genotóxico causado por el parásito adulto de *T. solium* demostrando el efecto protector contra el daño de DNA. Sin embargo el potencial genotóxico de la rTsCRT en ratones y especialmente en el modelo de colitis inducido por sulfato de trinitrobenceno (TNBS) no ha sido investigado.

Metodología

Inmunización con calreticulina recombinante de *Taenia solium* (rTsCRT) e inducción de colitis

Se utilizaron ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas de edad, 5-6 ratones por cada grupo. Los animales se mantuvieron en un bioterio bajo condiciones libres de patógenos, con agua y alimento estériles ad libitum. Los grupos experimentales se dividieron en el siguiente orden:

- Grupo 1 - Buffer de bicarbonato (BBC)
- Grupo 2 - 50 µg de rTsCRT (rTsCRT)
- Grupo 3 - 4 mg de TNBS
- Grupo 4 - 50 µg de rTsCRT+4 mg TNBS

Los ratones recibieron 4 dosis de 50 µg de rTsCRT en 200 µl de buffer bicarbonato (BBC) o BBC únicamente, con intervalos de 1 semana a través de un catéter flexible por vía oral según lo reportado por (50). La colitis se indujo 4 días después de la última inmunización mediante la administración intra-rectal de 150µl de una solución de 50% etanol con 4mg de TNBS (Sigma) utilizando un catéter flexible de 3.2 cm de largo (52). Los grupos control recibieron 150 µl buffer de fosfatos salina (PBS). Los animales se sacrificaron 72 horas post administración del TNBS con una sobredosis de sevoflorano de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (53) para el Cuidado y Uso

de Animales de Laboratorio. Se realizaron dos experimentos independientes. Se colectaron 25 μ l de sangre de cada ratón en tubos eppendorf con 25 μ l de heparina.

Determinación clínica del grado de enfermedad

Previo a la necropsia se les asignó a los ratones una escala de índice de enfermedad de 0 a 8 de acuerdo a parámetros reportados en la literatura: pérdida de peso, piloerección, inmovilidad, conjuntivitis y consistencia de las heces/sangrado. Cada parámetro se consideró en una escala numérica de 0 a 2, donde 0=ausente, 1=moderado, 2=severo (54). En el caso de peso, una pérdida <10% tiene un valor de 1, mientras que en el caso de pérdida de peso >10% corresponde a 2 (estado severo). El estado de salud se evaluó durante los 3 días consecutivos desde el momento de la inducción con TNBS y se hizo una correlación de Spearman y comparación en el programa de GraphPad utilizando los datos de los MN de ambas técnicas y el promedio de la escala de enfermedad de los tres días posteriores al tratamiento con TNBS.

Análisis de MN por microscopía de fluorescencia

Se realizaron frotis de la sangre periférica por duplicado, utilizando 5-7 μ l de sangre por cada laminilla, obtenida de los diferentes grupos y se fijaron en metanol absoluto durante 10 min. Laminillas se limpiaron previamente con etanol al 70%, se tiñeron con naranja de acridina a concentración de 1mg/ml (AO, Sigma–Aldrich) y se evaluaron por microscopía de fluorescencia de manera cegada (55). Para la determinación de citotoxicidad se tomaron en cuenta el número de reticulocitos (RET) por 2000 eritrocitos maduros/normocromáticos (NC) (RET/2000 NC), que refleja el nivel basal de la producción de RET en médula ósea. Si la cuenta final de RET/NC pasaba más

de 2000 NC se utilizaba la regla de tres, por ejemplo, si el conteo llegaba al 35 RET en 2030 NC, aplicando la fórmula sería $35 \times 2000 / 2030 = 34.48 \text{ RET}/2000 \text{ NC}$. La misma regla se aplicaba para el parámetro de genotoxicidad donde se contaba el número de MN en 1000 RET (MN/RET).

Determinación de MN mediante citometría de flujo

En la fase preanalítica (previa a la adquisición en el citómetro de flujo), se fijaron 15 μl de sangre de los ratones de cada grupo con 500 μl de metanol a -20°C mediante un vortexeo para su fijación homogénea durante 1 minuto y se guardaron a -70°C durante 24 h como mínimo. Para la tinción de los MN, las muestras se descongelaron y se lavaron con 1000 μl de Buffer de bicarbonato (BBC, pH 7.5) dos veces para eliminar la heparina y el metanol. Después de quitar el sobrenadante (SN) con la pipeta se añadieron 1000 μl de BBC, se tomaron 10 μl de la suspensión celular y se agregaron 990 μl de BBC (dilución 1:100) para contar el número de células en la cámara de Neubauer y se ajustó a la cantidad de células a 4×10^6 por cada muestra, llevando el volumen final a 100 μl de BBC. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 8 minutos a 4°C . El SN se retiró y las células se incubaron con 25 μl de RNAsa a una concentración de 1.2 mg/ml (10mg/ml, Thermo scientific) a una concentración de 1.2 mg/ml a 37°C durante 50 minutos (56) para eliminar del RNA. Posteriormente las células se resuspendieron manualmente, se añadieron 100 μl de BBC se centrifugaron en las mismas condiciones descritas anteriormente para eliminar la RNAsa restante. Se retiró el SN, se añadieron 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de anticuerpo anti-CD71-FITC (BioLegend) y se incubaron durante 30 min a 4°C agitando levemente para asegurar una reacción homogénea del anticuerpo con su receptor. El grupo control recibió 100 μl de BBC. Después, se añadieron 50 μl de Ioduro de Propidio (PI Sigma Aldrich) a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (49) y se incubó a 4°C

durante 25 minutos. Posteriormente las células se lavaron con 150 μ l de BBC, centrifugaron y se añadieron 500 μ l de BBC. Las células tratadas se trasladaron a los tubos de citometría para la lectura. Una vez finalizada la etapa preanalítica, se procedió a la adquisición de las muestras en el citómetro FACS Canto II de BD Biociencias (San Jose California, USA) con el software FACS Diva Versión 6.1.

Los parámetros de adquisición se calibraron con las perlas de calibración (Miltenyi Biotec) y perlas de compensación (MACS Comp Bead Kit I) y se detectaron los voltajes adecuados para la mejor visualización de la población. Antes de adquirir las muestras de compensación de FITC y PI por el citómetro se pasó una muestra control, sin tinción, para poder estandarizar los voltajes de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) y de autofluorescencia celular de FITC y de PI. Para la compensación de fluorocromo FITC, se tomó una gota de las perlas de compensación de FITC en 500 μ l de buffer BBC, para la compensación de PI se tomó la muestra con las células teñidas solo con PI. Al terminar la compensación de FITC, PI y de la autofluorescencia (células sin la tinción), se construyó la matriz de compensación automatizada, la cual se aplicó para todas las muestras experimentales. De cada tubo se adquirieron al menos 10,000 eventos positivos a CD71 y a PI, que se ha reportado corresponden a los RET (38). Esto equivalió, en la mayoría de las muestras a adquirir aproximadamente 520,000 eventos totales.

Algoritmo de interpretación de datos de criometría de flujo

Se utilizó el programa Flowjo versión 10.1, se seleccionó la mayor población según la distribución del tamaño (FSC, forward scatter por sus siglas en inglés) y granularidad (SSC, side scatter, por sus siglas en inglés) en un dot plot (gráfica de puntos) y se nombró como la ventana P1, que representa a los eritrocitos (Fig. 1A). Los análisis de

los dot plots donde no se ve claramente el área de P1 no se tomaron en cuenta ya que la muestra de sangre estaba degradada. La muestra teñida con PI se usó para la generación de ventanas (gating) y posición de las coordenadas para descartar la señal de autofluorescencia (47).

Una vez que se seleccionó el área de P1, se hace la eliminación de dobletes, células pegadas que pasaron por la celda de flujo y su señal es falsa, esto se realiza mediante la selección de parámetro de altura contra el área (Fig. 1B). El tercer paso de la generación de las ventanas es para determinar el criterio de la autofluorescencia que aumenta por la penetración de PI. Los parámetros usados en este gating P3 son el canal de PI contra la granularidad (SSC), donde aparece la población celular con baja fluorescencia en la parte inferior del dot plot, considerada como el área de autofluorescencia y es negativa al PI. Las células positivas al PI con fluorescencia alta, que se encuentran en la parte superior del dot plot son células con DNA dañado, que contienen los MN, en donde el PI se une específicamente, por lo que éstas brillan más y se separan de la población con autofluorescencia; estas células son eritrocitos y reticulocitos micronucleados (Fig. 1C). Finalmente, teniendo las ventanas P1, P2 y P3, se genera la ventana P4 con los parámetros de ambos canales FITC y PI y se aplican las coordenadas al dot plot dividiendo la población celular en las cuatro ventanas que representan lo siguiente: 1) NCE: células negativas a anti-CD71-FITC y PI, son eritrocitos maduros; 2) MN-NCE: células negativas a la señal de anti-CD71-FITC y positivas a PI, son eritrocitos que tienen MN; 3) RET: células positivas a anti-CD71-FITC, son RET; 4) MN-RET: células positivas a ambas señales, anti-CD71-FITC y PI que son los RET con MN (Fig 1D). El dato de la frecuencia de los MN-RET se reporta en porcentaje, a partir del número absoluto de eventos en cada ventana

del dot plot obtenido del programa FlowJo y se utiliza la siguiente fórmula: %MN-RET = (MN-RET/ (RET+MN-RET)) x 100 (47).

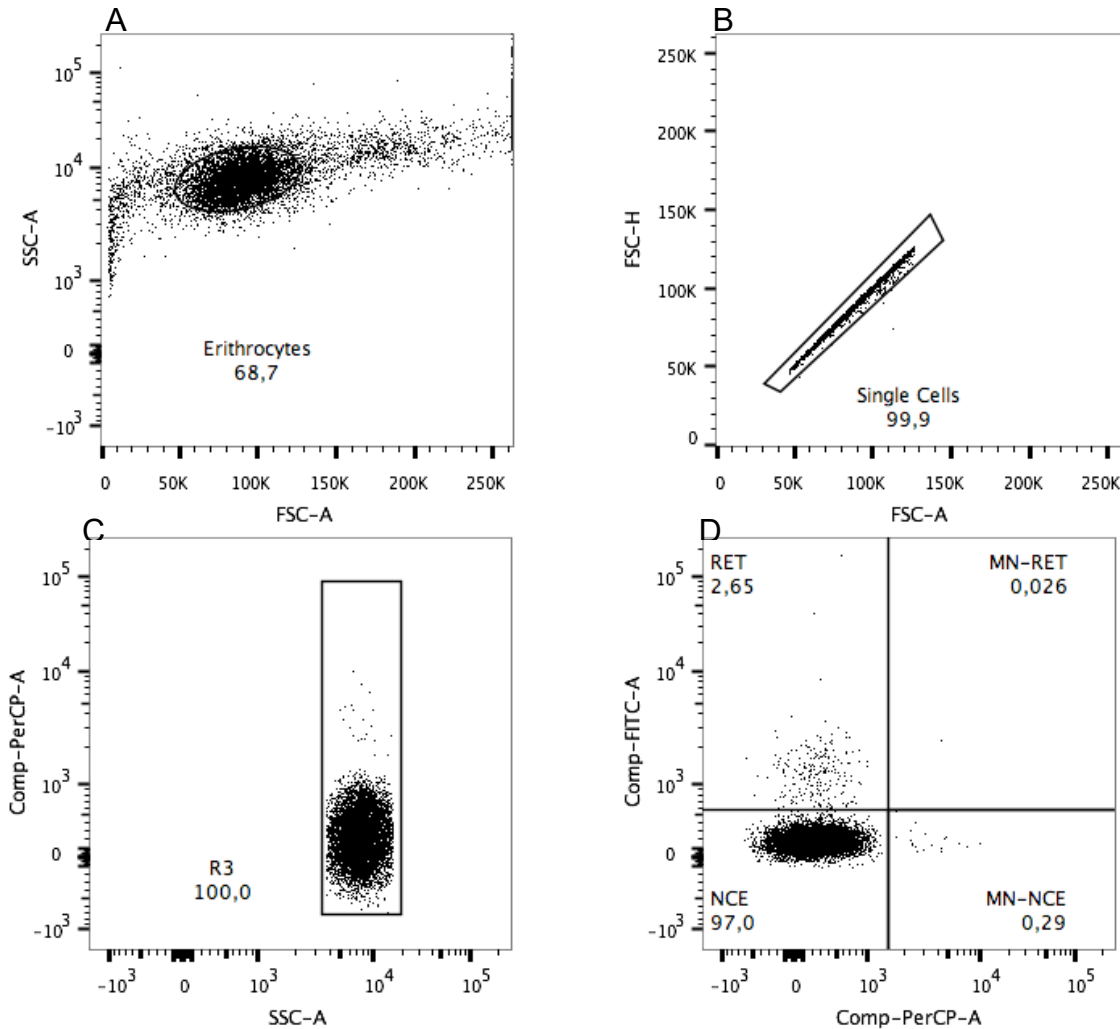


Figura 1. Esquema del algoritmo para determinación de MN. (A) Gráfica de puntos de tamaño (FSC) contra la granulidad (SSC) de los eritrocitos. (B) Gráfica de puntos de tamaño señal integral (FSC-A) vs señal pico (FSC-H) de donde se seleccionan eventos sencillos (sin agregados). (C) Gráfica de puntos que muestra las células con alta o baja fluorescencia correspondiente al PI. (D) Gráfica de puntos que muestra las cuatro poblaciones celulares: NCE- eritrocitos normocromáticos maduros negativos al PI y anti CD71, MN-NCE- eritrocitos normocromáticos micronucleados negativos a anti-CD71 y positivos a PI, RET- reticulocitos positivos al anti-CD71 y negativos a PI y MN-RET- reticulocitos micronucleados positivos a ambos marcadores(anti-CD71yPI).

Resultados

Determinación de los MN por la técnica de microscopía de fluorescencia

Se determinó el número de MN como marcador de genotoxicidad en los diferentes grupos de ratones y se confirmó que el TNBS aumenta la frecuencia de MN (5MN/1000RET) y que la inmunización oral con la rTsCRT previene la formación de los mismos en los ratones a los que se les indujo colitis mediante la administración intra-rectal de TNBS que fueron previamente tratados con rTsCRT oral (1MN/1000RET). Además, se verificó que la rTsCRT por sí sola no es genotóxica, ya que los ratones que recibieron rTsCRT sola no demostraron producción alta de MN (<3,5) (Fig 2A). Otro parámetro que se verificó en la técnica, es la de citotoxicidad, que mide la producción basal de RET en médula ósea con el fin de descartar daño citotóxico. Se verificó que los RET se producen de manera normal en la médula ósea y se determinó que el porcentaje de la producción de los RET varía entre 1.2 a 2.5% (Fig 2B), lo que coincide con la producción basal que se reporta en la literatura.

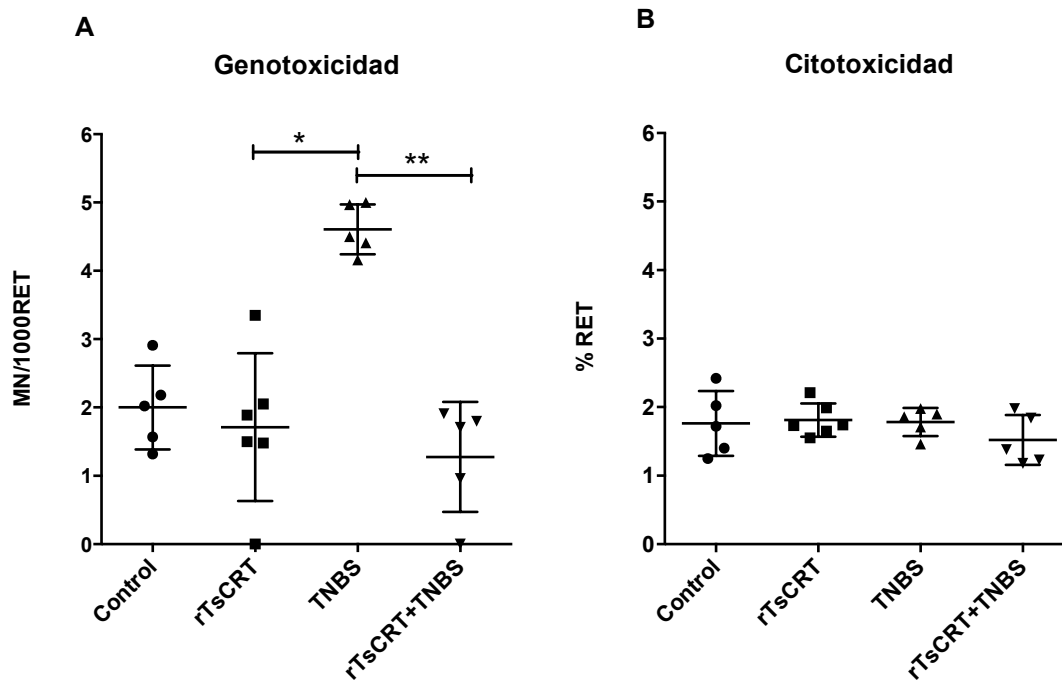


Figura 2. Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad en el modelo murino de colitis mediante microscopía de fluorescencia. (A) Conteo de los MN en 1000 RET muestra el aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de MN producidos por TNBS y el efecto protector de la rTsCRT (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: Kruskal wallis). (B) Evaluación del número de RET en 2000 NC que muestra la citotoxicidad e indica que los RET se están produciendo normalmente y que la rTsCRT y el TNBS no afectan el nivel de la producción de los RET.

Determinación de los MN por la técnica de citometría de flujo

Para la estandarización de la técnica, primero se hizo la titulación de anticuerpo anti-CD71-FITC. Se probaron 5 concentraciones de anti-CD71-FITC: 0.0625 μg , 0.125 μg , 0.25 μg , 0.5 μg y 1 μg en 100 μl de buffer usando 4 millones de células. Para determinar el pegado específico entre el anticuerpo y su receptor se usa la relación del factor de intensidad mediana de fluorescencia (MFI) positiva entre la negativa. Es decir, si existe en la muestra células que al unirse con el anticuerpo acoplado al fluorocromo brillan más y otras brillan menos (porque tienen menos receptores del anticuerpo), este factor toma en cuenta la mayoría de la población celular que interactúa con el anticuerpo de manera homogénea. Entre más alta es la relación de

MFI positiva contra negativa (MFI+/MFI-), el pegado de anticuerpo es más específico. En la figura 3 se muestra la gráfica de la relación de MFI+/MFI- usando las diferentes concentraciones de anti-CD71-FITC. Se observa que el punto más alto se obtiene cuando se utiliza 1 µg/100 µl de anticuerpo. En la figura 4 se muestran las gráficas de puntos y los histogramas del grupo control muestra no marcada (A, C) y la muestra tratada con anti-CD71-FITC (B, D). En el cuadrante de RET del dot plot B, de la muestra teñida con anti- CD-71-FITC aparecen 1.84% de RET y en el cuadrante de NCE 98.2%, estos datos corresponden al resultado de la producción normal de los RET entre 1-3 % de RET en el ratón.

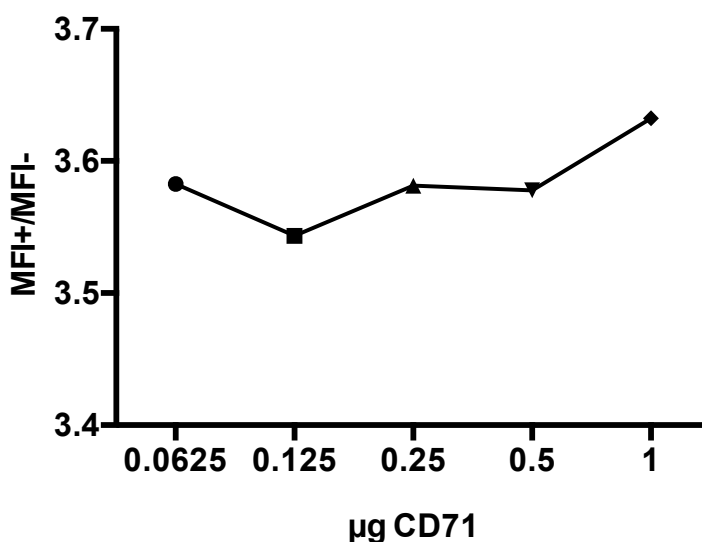


Figura 3. La relación entre el MFI positivo y negativo en la muestra teñida con diferentes concentraciones de anti-CD71-FITC. Se hicieron 5 diluciones seriadas de anti-CD71- FITC de 0.0625 µg a 1 µg/100 µl de buffer de carbonatos. El punto más alto del pegado específico de anti-CD71-FITC con su receptor se observa con 1 µg de anticuerpo.

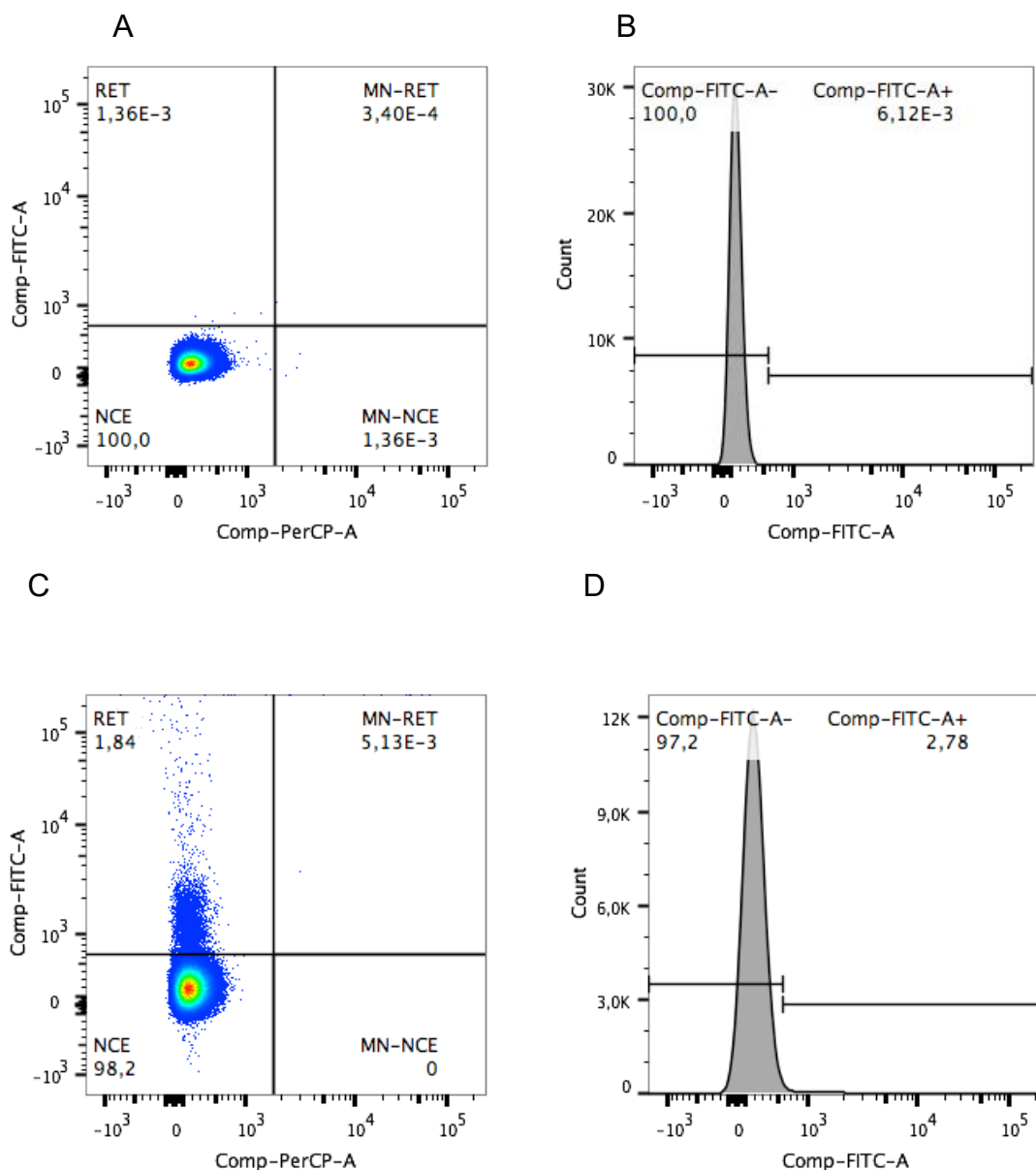


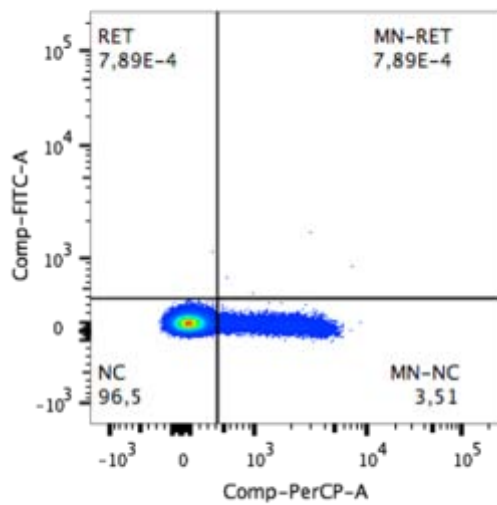
Figura 4. Titulación del anticuerpo anti-CD71-FITC. Gráfica de puntos del grupo control sin el marcaje con anti-CD71-FITC. (A) Gráfica de puntos donde aparecen el 100% de los eritrocitos maduros en el cuadrante (NCE-eritrocitos normocromáticos). (B) Histograma del mismo grupo donde se ve la división entre toda la población negativa a partir de cual va aparecer la población positiva en caso de la tinción. (C) Gráfica de puntos de la muestra teñida con anti CD-71-FITC donde en el cuadrante de RET aparecen 1.84% de RET y en el cuadrante de NCE 98.2 %. (D) Histograma con la población negativa al CD 71-FITC de 97.2 % y 2.78% anti CD71-FITC positiva.

También se realizaron las titulaciones con RNAsa y PI para determinar la concentración adecuada de RNAsa, se tomaron 3 concentraciones diferentes de RNAsa: 0.3 mg/ml; 0.6 mg/ml y 1.2 mg/ml con la misma concentración de PI (25 μ) y se determinó que con 1.2 mg/ml de RNAsa es suficiente para destruir toda la RNAsa celular. Los datos se muestran en el cuadro 1, donde se observa que con el aumento de la concentración de RNAsa, hay una disminución de las células PI positivas, lo que refleja la destrucción de RNA presente en los NC y RET. En figura 5 se observa la disminución de 3.52% de MN en normocromáticos (MN-NCE) en una muestra teñida sólo con PI sin RNAsa (A), comparado con la muestra teñida con PI en presencia de 1.2 mg RNAsa (B), donde se observa el efecto de la disminución de MN-NC a 0.45% MN-NC.

Cuadro 1. Frecuencia de MN-NC con las diferentes concentraciones de RNAsa

RNAsa	0 mg/ml	0.3 mg/ml	0.6 mg/ml	1.2 mg/ml
Frecuencia de (MN-NC)	3.51%	0.81%	0.75%	0.45%

A



B

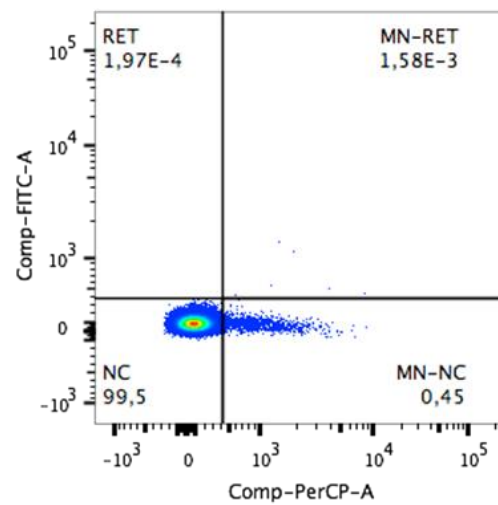


Figura 5. Gráfica de puntos del marcaje con Ioduro de propidio (PI) y RNAsa. (A) Tinción solo con PI. (B) Tinción con 1.2 mg/ml de RNAsa y con PI, el porcentaje de MN-NC disminuye con el tratamiento de RNAsa.

Ya que se determinó la concentración óptima de RNAsa y de anti-CD71-FITC, se verificó el efecto de la concentración de PI para optimizar la detección de MN en RET. Se tomaron 3 concentraciones diferentes de PI: 25 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$. En la figura 6 se muestran los dot plots de las tres concentraciones de PI en una muestra de sangre de ratón del grupo control. Usando 100 $\mu\text{g/ml}$ de PI (Fig. 6C) se observa una amplia expansión de la población negativa en el cuadrante NC, que también se refleja en los RET, comparado con las concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 6B) y 25 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 6A) donde la población de NC y de RET es más compacta. Para determinar la mejor concentración de PI lo que se busca es la mejor detección de los MN en RET. El dato de la frecuencia de los MN-RET se reporta a partir del número absoluto de cada dot plot usando el programa FlowJo y se utiliza fórmula de la siguiente manera: $\% \text{MN-RET} = (\text{MN-RET} / (\text{RET} + \text{MN-RET})) \times 100$ (47). En el cuadro

2 aparece el resumen de las frecuencias de MN calculadas por la fórmula de Balmus donde el resultado más alto aparece con 50 $\mu\text{g/ml}$ de PI, con una detección de 2.78% de MN.

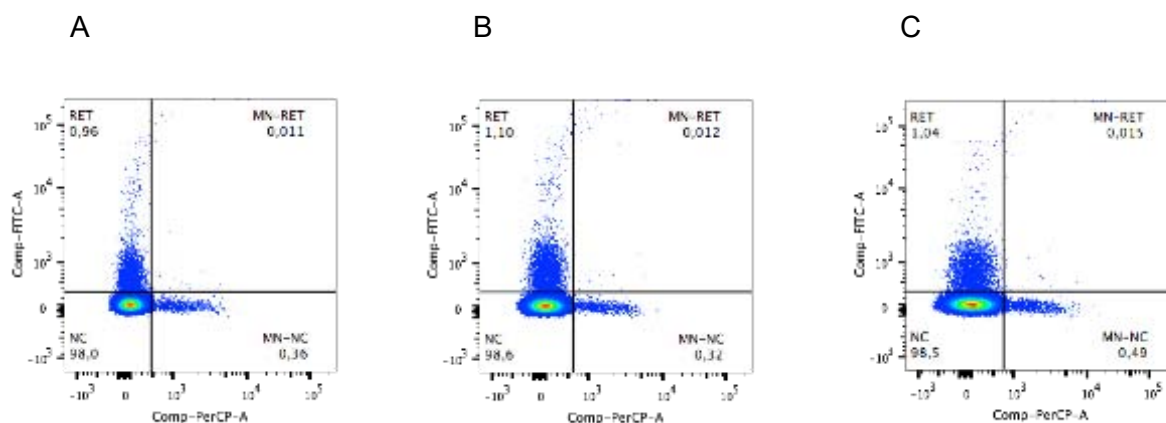


Figura 6. Gráfica de puntos de las muestras teñidas con anti-CD71-FITC, RNAsa y diferentes concentraciones de PI. (A) Células teñidas con 25 $\mu\text{g/ml}$ de PI. (B) Células teñidas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de PI y (C) células teñidas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de PI.

Cuadro 2. Frecuencias de los MN-RET con concentraciones diferentes de PI

[C] PI/ %	% MN- RET
100 μg PI + RNAsa	1.22
50 μg PI + RNAsa	2.78
25 μg PI + Rnasa	1.34

Ya estandarizadas todas las condiciones, se realizaron 5 experimentos con las muestras de los cuatro grupos: 1) grupo control; 2) grupo con la rTsCRT; 3) grupo con TNBS y 4) grupo con rTsCRT y TNBS. En cada experimento se utilizó la misma plantilla de adquisición en el citómetro, con la compensación adecuada y con la muestra control sin tinción, muestra control de PI solo, muestra de PI+RNAsa y muestra con anti-CD71-FITC para tener controles del experimento. Tanto para la técnica de microscopía de fluorescencia como para la de citometría de flujo se tomó la sangre de mismos ratones y resultado de cual fue comparado entre ambas técnicas. Para la determinación final de los MN-RET se usó la fórmula de Balmus (47). El dot plot de tamaño (FSC) contra la granularidad (SSC) se utilizó para verificar la distribución apropiada de las poblaciones. Si no se reconocía bien una población de eritrocitos, la muestra no se incluía en el análisis. Los resultados se muestran en la figura 7. En la gráfica de genotoxicidad (Fig. 7A) se observa que hubo un incremento significativo en la producción de los MN en el grupo con TNBS comparado con el grupo control. En los ratones tratados con rTsCRT el daño genotóxico causado por el TNBS no es significativo, sin embargo, hubo una tendencia de disminución. Además, se confirmó el efecto no genotóxico de la rTsCRT porque no se encontró aumento de la frecuencia de MN. En la gráfica de citotoxicidad (Fig. 7B) se muestra la producción normal de los RET sobre todo en los grupos control y rTsCRT. En los grupos TNBS y rTsCRT se observó una disminución de RET que puede representar el efecto citotóxico producido por el TNBS, sin embargo, éste no alcanza significancia estadística.

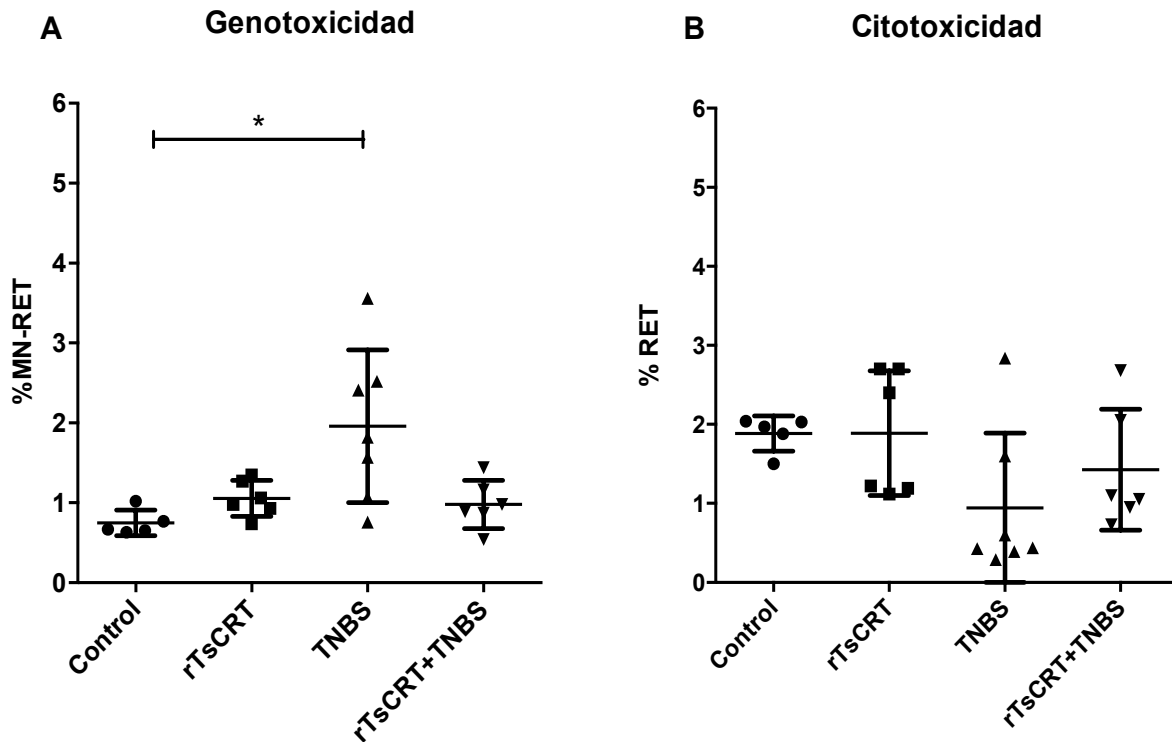


Figura 7. Frecuencia de MN en RET (genotoxicidad) y porcentaje de RET (citotoxicidad) por citometría de flujo. (A) Gráfica de genotoxicidad que ilustra la frecuencia de MN en los diferentes grupos experimentales. La rTsCRT no aumenta la producción de MN (n=6). En el grupo de TNBS (n=7) hay una mayor frecuencia de MN estadísticamente significativa comparada con el grupo control (n=5) (* P< 0.05: Kruskal-Wallis). (B) Gráfica de citotoxicidad que ilustra la frecuencia de RET en 2000 NC.

Correlación de la frecuencia de MN con el índice de enfermedad

Para averiguar la relación que puede tener el tratamiento de TNBS y los datos de enfermedad con el aumento de MN, se hizo una correlación entre el estado de salud y la frecuencia de los MN por ambas técnicas. En la figura 8 se observa que hay una correlación positiva entre índice de enfermedad y mayor frecuencia de MN determinada con ambas técnicas (microscopía $r=0.558$ con $p< 0.05$; citometría $r=0.613$ con $p< 0.01$). Se observa que la frecuencia de MN analizada por citometría de

flujo es más alta que la frecuencia obtenida mediante microscopía de fluorescencia. Sin embargo, ambas técnicas correlacionaron con el índice de enfermedad.

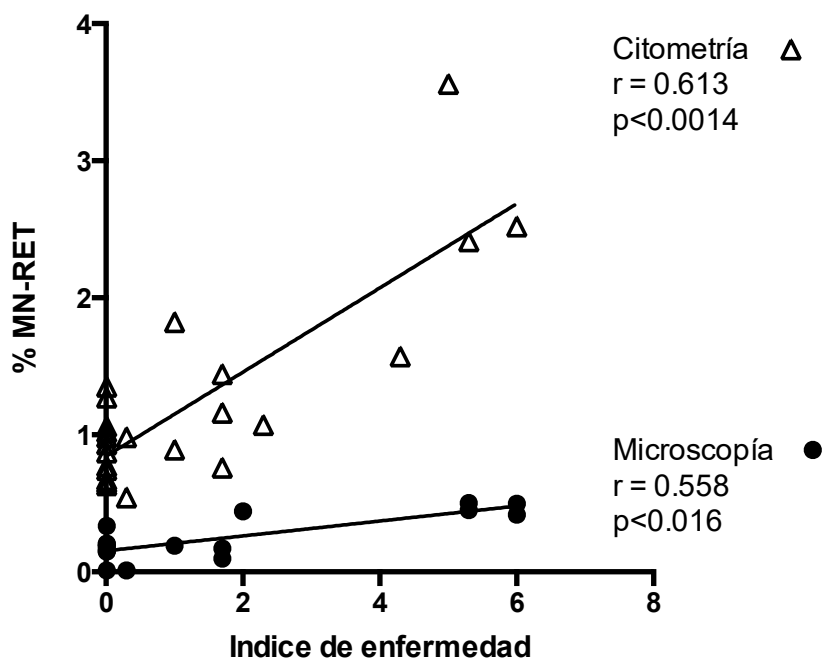


Figura 8. Correlación entre el estado de salud/índice de enfermedad y frecuencia de MN evaluadas por las dos técnicas. Gráfica de correlación de Spearman entre la frecuencia de MN por la microscopía de fluorescencia de cada ratón ($n=18$, $p < 0.05$) y por la citometría de flujo ($n=25$, $p < 0.001$) versus el índice de enfermedad de cada ratón.

Discusión

En este trabajo se estudió el efecto genotóxico de la rTsCRT en un modelo de colitis murino inducido por TNBS. Se encontró que la administración previa de la rTsCRT en el grupo de TNBS protegió contra el daño de DNA causado por la inflamación intestinal, reflejado como el aumento de MN producido por el agente genotóxico. Además, se demostró que los ratones que recibieron únicamente rTsCRT no mostraron números altos de MN, sino que su frecuencia era muy parecida al grupo control, por lo que se demostró que la rTsCRT no es genotóxica. Adicionalmente, se observó que no se afectó la producción de los eritrocitos/reticulocitos en todos los grupos experimentales, incluyendo el de TNBS, lo que sugiere que no hay daño citotóxico estadísticamente significativo y descarta la posibilidad de un daño celular previo. Además, se demostró y se confirmó el daño al DNA producido por el TNBS mediante la técnica de citometría de flujo, lo que implica que la estandarización de la técnica fue exitosa. Este trabajo, por lo tanto, demuestra el potencial preventivo de la rTsCRT contra la colitis y el daño genotóxico, además de que el daño al DNA puede ser evaluado por la técnica citometría de flujo que es más reciente, rápida y objetiva comparada con la microscopía de fluorescencia. Estos resultados están en acuerdo con un trabajo previo sobre la genotoxicidad en modelo de teniosis en hámsteres, en donde la administración de la rTsCRT redujo la producción de los MN en la sangre periférica de animales con teniosis (40).

Como se había mencionado previamente, el TNBS se aplica diluido en etanol al 50%, penetra la mucosa y hapteniza las proteínas de la lámina propia, lo que resulta en una infiltración de los neutrófilos, macrófagos y liberación de citocinas proinflamatorias (15). Los macrófagos juegan un papel importante en la patología de la enfermedad secretando mediadores inflamatorios como IL-6, TNF- α , ácido nítrico (NO) y

prostaglandinas (9). La inflamación intestinal crónica, producida a través de estos mediadores proinflamatorios conduce a un daño irreversible del tejido intestinal lesionándolo y conduciendo a las IBD, que se caracterizan por un aumento de los radicales libres (57, 58). Los radicales libres como el anión de superóxido (O_2^{\bullet}) o el radical de hidroxilo (OH^{\bullet}) pueden reaccionar con el DNA causando rompimientos de la doble hélice aumentando la posibilidad de la producción de los MN que son biomarcadores del daño genético (59). Probablemente, ratones que recibieron únicamente TNBS tenían un aumento significativo de radicales libres los cuales condujeron al rompimiento del DNA. El daño causado no se pudo reparar por las enzimas antioxidantes como SOD (dimutasa de superóxido) o por los mecanismos de reparación de DNA como NER (nucleotide excision repair, por sus siglas en inglés) (30) y pudo resultar en la producción de los MN cuyo aumento se observa en este grupo. Sería muy interesante medir el estrés oxidante a través de la medición de H_2O_2 o enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como la mieloperoxidasa para poder probar esta hipótesis. Por otra parte, a los ratones que se les administró la rTsCRT previamente y se indujo colitis no hubo un aumento significativo en MN demostrando el efecto protector de la rTsCRT contra el daño al DNA. Interesantemente, en el estudio de Sener y colaboradores (60), donde utilizan modelo de colitis inducido por TNBS en ratas, demostraron que el uso de erdoesteina, un fármaco antioxidante, disminuyó la generación de radicales libres y el daño al DNA preservando del daño al intestino. En otro estudio utilizaron flavonoides, que tienen propiedades antioxidantes después de la inducción de colitis con TNBS y también demostraron una reducción en la genotoxicidad y además la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias, lo que indica una relación entre la presencia de citocinas proinflamatorias y el daño genotóxico (9). Nuestros resultados de ambas técnicas

sugieren que la rTsCRT podría tener potencial como un antioxidante reduciendo la acumulación de radicales libres y preveniendo la formación de MN, sin embargo, habría que demostrarlo.

Se ha documentado el papel del NO en la patología de las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD) y en especial en el modelo de colitis producido por TNBS (9, 11). En el intestino existe una enzima que sintetiza óxido nítrico, la óxido nítrico sintasa (NOS) y se presenta en dos isoformas: una calcio dependiente que se llama c-NOS, que cataliza la producción mínima y constitutiva de NO para mantener las funciones fisiológicas básicas del intestino, como motilidad, absorción y secreción; la segunda isoforma es iNOS, que es calcio independiente, sintetiza NO de manera inducible, la cual una vez estimulada, produce cantidades excesivas de NO, conduciendo a la lesión intestinal (61). En varios estudios sobre los inhibidores de iNOS, como el L-N6 (1-iminoethyl) lisine dihydrochloride (L-NIL), han reportado el decremento en la producción de las citocinas proinflamatorias y radicales libres (9, 11, 57). Además, usando productos con propiedades de antioxidantes en el modelo de colitis en ratas y ratones como un método preventivo o como tratamiento, se demostró la importancia del prevenir la producción de los radicales libres que dañan el DNA y su papel en la patología de la inflamación intestinal (11) (9, 60). La rTsCRT es una proteína que une Ca^{2+} , lo que abre una posibilidad de que en presencia de la rTsCRT haya funcionamiento de la enzima c-NOS dependiente de calcio e inhibición de la iNOS que produce NO en cantidades elevadas y afecta al daño de DNA. En el trabajo de Liu y colaboradores (62) donde analizaron el potencial de la CRT asociado a la regulación de Ca^{2+} en una línea células epiteliales renales de cerdo, se demuestra un papel fundamental de la CRT en la prevención del estrés oxidativo causado por el tóxico iodoacetamida alcalina, ya que mantiene los niveles adecuados del calcio

intracelular. Las bombas de flujo iónico de las membranas de ER y de la mitocondria trabajan en forma conjunta para mantener el Ca^{2+} intracelular, cuyo aumento en el citosol conduce, entre varias consecuencias, al colapso del potencial de la membrana mitocondrial, lo que en consecuencia causa estrés oxidativo; la CRT secuestra el Ca^{2+} y previene el estrés oxidativo (62). El estrés oxidativo puede resultar en daño al DNA y por consiguiente en la formación de MN (35). Asimismo, en un estudio diferente, se demostró que la sobreexpresión de CRT recombinante con capacidad de unir a Ca^{2+} en la planta de tabaco, disminuye los ROS producidos a través del estrés oxidativo (26). Estos estudios sugieren que la CRT tiene un papel como antioxidante por lo que sería de gran interés analizar si la rTsCRT tiene esa propiedad, ya que sería un posible mecanismo por el que la rTsCRT está disminuyendo la formación de MN en el presente estudio.

Se sabe que la infección con helmintos o sus productos de secreción/excreción son capaces de polarizar la respuesta inmune hacia una respuesta inmunomodulada, anti-inflamatoria que presenta perfil de tipo Th2 o reguladora, donde se producen, entre varias citocinas, la IL-4 y niveles altos de IL-10 (1, 7, 63). La IL-10 tiene un papel esencial en el control de la respuesta adaptativa en la inflamación contribuyendo al balance entre la inflamación y la inmunorregulación, favoreciendo respuestas reguladas. Recientemente en el laboratorio se demostró que la rTsCRT induce la expresión de las citocinas IL-10 y la IL-4 en los órganos linfoides de hámsteres, que contribuyen al mantenimiento de la respuesta anti-inflamatoria de tipo Th2 e inhibición de la respuesta inflamatoria de tipo Th1 (63). La rTsCRT podría provocar el decremento de MN a través del decremento de los radicales libres inducidos por la respuesta de tipo Th1 como resultado del tratamiento con TNBS, ya que la rTsCRT induce la expresión de IL-4 y IL-10 e inhibe la respuesta tipo Th1 conduciendo a la

disminución del TNF- α y otras citocinas proinflamatorias que conducen a la acumulación de estrés oxidativo que daña al DNA. Al respecto, en nuestro grupo de trabajo hemos observado que el tratamiento con rTsCRT disminuye las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 inducidas por el tratamiento con TNBS (Mendlovic et al, datos no publicados), por lo que sería necesario demostrar además que el tratamiento con rTsCRT en el grupo con TNBS, produce menos radicales libres comparado con el grupo con TNBS solo.

En varios trabajos sobre la detección de MN como marcadores del daño genotóxico se ha hecho la comparación y correlación entre las técnicas de análisis de MN por microscopía de fluorescencia y de citometría de flujo, donde se confirman resultados comparables entre ambas (64, 65). En nuestro estudio se trató obtener la gráfica de correlación con los datos de mismos ratones evaluados por ambas técnicas, pero no hubo una correlación significativa. Una de las explicaciones es que probablemente no fueron reportados suficientes datos de los ratones evaluados por ambas técnicas. El análisis mediante microscopía se realizó de manera cegada y sólo se evaluaron tres ratones por grupo, dentro de cuales habían muestras que no se tomaron en cuenta por tener un valor menor a 700 RET. Por otra parte, se pudo evaluar más ratones por citometría de flujo, pero la mayoría de éstos no fueron los mismos que se evaluaron por la microscopía, por lo que se sugiere evaluar las laminillas restantes para poder hacer el análisis de correlación de las dos técnicas.

En la gráfica de correlación del índice de enfermedad y frecuencia de MN por ambas técnicas, los resultados por la técnica de citometría de flujo son más altos comparados con la técnica de microscopía. En trabajos previos de correlación de los MN entre ambas técnicas frecuentemente se evalúan diferentes concentraciones y tipos de genotóxicos (35, 66). Los resultados varían dependiendo de la concentración de genotóxico; hay dosis en las cuales la frecuencia de MN por la técnica de microscopía resulta ser más baja que por la técnica de citometría (como en nuestro caso) y hay dosis del mismo genotóxico, donde la frecuencia de MN por microscopía es mayor (67). Tomando en cuenta estos resultados se puede sugerir que habría que analizar las dosis más bajas y altas de TNBS para ver su impacto en la producción de los MN por ambas técnicas. Cabe destacar que a pesar de que en el presente proyecto se observaron diferencias en la frecuencia de MN entre las dos técnicas, ambas confirman que el tratamiento con TNBS se correlaciona con un índice de enfermedad mayor, mientras que el tratamiento con rTsCRT previene la formación de MN, por lo que la presencia o ausencia de genotoxicidad se confirma por ambas técnicas .

La citometría de flujo tiene varias ventajas con respecto a la microscopía, como una alta sensibilidad debido a que es posible evaluar muchos eventos en un tiempo corto, de manera automatizada y se requiere una muestra pequeña de sangre. En nuestro trabajo se evaluó la frecuencia de MN, tanto por la técnica de microscopía de fluorescencia, como por la citometría de flujo y se demostró el efecto protector de la rTsCRT al administrarla previamente en el grupo de TNBS comparado con los ratones que recibieron únicamente TNBS y que se refleja en una frecuencia baja de MN. Por la técnica de microscopía, el resultado alcanzó diferencias estadísticamente significativas, sin embargo por la técnica de citometría de flujo sólo se ve una

tendencia de la disminución de los MN en el grupo con la rTsCRT+TNBS. En ocasiones no se tomaron en cuenta algunas muestras por varias razones, como la distribución homogénea de la población de eritrocitos/reticulocitos, reflejada en los dot plots de tamaño (FSC) contra la granularidad (SSC). En otras ocasiones la muestra se desviaba mucho hacia la derecha, requiriendo mover las coordenadas de los ejes del dot plot demasiado. Para poder obtener resultados objetivos y confiables, estas muestras se excluyeron del análisis final de la técnica de citometría de flujo. El parámetro de la sensibilidad de cada técnica tiene mucha importancia en los valores que se obtienen de ellas. Por ejemplo, en la técnica de microscopía de fluorescencia, es necesario contar al menos 1000 RET por laminilla. Frecuentemente hay situaciones, donde después de leer toda la laminilla el investigador no llega a contar 1000 RET, sino 700-800 RET, esto ocurre por varias razones, como por ejemplo, la producción de los RET en este ratón. En este caso, el investigador aplica una regla de tres (explicada en la sección de Material y Métodos) y solo toma el resultado de conteo arriba de 700 RET para poder acercarse a la norma del ensayo que son 1000 RET y saca la frecuencia aproximada de MN en 1000 RET, disminuyendo la sensibilidad de esta técnica. En caso de no llegar al menos de 700 RET el resultado no se toma en cuenta. En contraste, en la técnica de citometría de flujo, donde se pueden contar un mayor número de células (hasta aproximadamente 520,000 de los eritrocitos y 16,000 eventos de los RET) el ensayo permite sacar la frecuencia de MN de mayor número de muestras, lo que aporta una información más sensible y objetiva. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de TNBS y el grupo de TNBS + rTsCRT, aunque sí se observa la tendencia de disminución en la frecuencia de MN en el grupo tratado con rTsCRT, por lo que

aumentar el número de ratones en todos los grupos podría disminuir la desviación estándar para alcanzar la significancia estadística (68).

Respecto al parámetro de genotoxicidad, tanto el grupo control como el de rTsCRT dieron resultados muy parecidos por las dos técnicas, lo que confirma que la rTsCRT no es genotóxica. En cuanto a la citotoxicidad, entre las dos técnicas en los grupos control y rTsCRT el resultado de la producción de los RET coincide con los valores reportados en la literatura que es entre 1-3% (47), lo que confirma que la rTsCRT no es citotóxica.

Desde el inicio de la inducción de colitis con TNBS se observó una diferencia en los síntomas de colitis entre los ratones que recibieron rTsCRT y los que no, por lo que se sugirió la posibilidad de que existiera una correlación entre el daño físico causado por la colitis y el daño genotóxico evaluado mediante la frecuencia de MN, es decir, si los valores de MN por la técnica de microscopía sería más altos en los grupos donde aparecieran los síntomas más severos (los que fueron tratados con TNBS). La mayoría de los ratones tratados solamente con TNBS físicamente se veían mal, pesaban menos y en éstos se encontró (por ambas técnicas) que la producción de los MN también era más alta comparado con otros grupos. La r de la correlación indica posible relación entre dos parámetros, que se aumenta al acercarse al 1 (69). En nuestro caso ambas r (de la técnica de microscopía y de citometría) fueron altas e indican la existencia de una correlación positiva de moderada a fuerte con un grado alto de asociación entre las variables con valores de p estadísticamente significativos (70). Este análisis sugiere una asociación entre la frecuencia de MN obtenida por las dos técnicas y el deterioro del estado físico de los animales tratados con TNBS. De aquí se puede concluir dos cosas: 1. Que los ratones tratados con TNBS en la mayoría de los casos tienen un número alto de MN comparado con los otros grupos.

2. Los resultados de los MN por la técnica de microscopía de fluorescencia demuestran un patrón parecido con los valores de MN por citometría de flujo, lo que indica que la técnica de citometría de flujo se puede usar en los siguientes estudios de investigación sobre la genotoxicidad sin la necesidad de trabajar con la microscopía de fluorescencia.

Conclusiones

En conclusión, en este estudio se evaluó el daño genotóxico producido por el TNBS y se utilizaron dos técnicas de medición de MN como un biomarcador de genotoxicidad. En ambas técnicas se demostraron resultados similares, lo que indica que el uso de la técnica de citometría de flujo puede ser utilizada en los siguientes trabajos sin la necesidad de utilizar la técnica de microscopía de fluorescencia. Además, este estudio demuestra que la administración de la rTsCRT no induce daño al DNA y puede aplicarse sin el riesgo de daño genotóxico. Este proyecto abre una nueva línea de investigación para estudiar la posible función como antioxidante de la rTsCRT para profundizar sobre los posibles mecanismos involucrados en su capacidad para disminuir los MN.

Literatura citada

1. Maizels RM, McSorley HJ, Smyth DJ. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2014 Jul;177(1):38-46.
2. McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. *Clin Microbiol Rev*. [Review]. 2012 Oct;25(4):585-608.
3. Hernandez JL, Leung G, McKay DM. Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *Int J Parasitol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2013 Mar;43(3-4):233-43.
4. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007 Feb;61(2):97-108.
5. Maizels RM. Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clin Microbiol Infect*. [Review]. 2016 Jun;22(6):481-6.
6. Broadhurst MJ, Leung JM, Kashyap V, McCune JM, Mahadevan U, McKerrow JH, et al. IL-22+ CD4+ T cells are associated with therapeutic trichuris trichiura infection in an ulcerative colitis patient. *Sci Transl Med*. [Case Reports Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Dec 1;2(60):60ra88.
7. Finlay CM, Walsh KP, Mills KH. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunol Rev*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2014 May;259(1):206-30.
8. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*. [Review]. 2014 Aug;18(4):279-88.
9. Marchi P, Paiotti AP, Artigiani Neto R, Oshima CT, Ribeiro DA. Concentrated grape juice (G8000) reduces immunoexpression of iNOS, TNF-alpha, COX-2 and DNA damage on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced-colitis. *Environ Toxicol Pharmacol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2014 Mar;37(2):819-27.
10. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. 1995 Oct;109(4):1344-67.

11. Venkataramana S, Lourenssen S, Miller KG, Blennerhassett MG. Early inflammatory damage to intestinal neurons occurs via inducible nitric oxide synthase. *Neurobiol Dis.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015 Mar;75:40-52.

12. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Akagiri S, Suzuki T, Hirata I, et al. Inhalation of carbon monoxide ameliorates TNBS-induced colitis in mice through the inhibition of TNF-alpha expression. *Dig Dis Sci.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Oct;55(10):2797-804.

13. Sasaki M, Elrod JW, Jordan P, Itoh M, Joh T, Minagar A, et al. CYP450 dietary inhibitors attenuate TNF-alpha-stimulated endothelial molecule expression and leukocyte adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol.* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004 Apr;286(4):C931-9.

14. Segui J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, et al. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Sep;76(3):537-44.

15. Morampudi V, Bhinder G, Wu X, Dai C, Sham HP, Vallance BA, et al. DNBS/TNBS colitis models: providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat. *J Vis Exp.* [Research Support, Non-U.S. Gov't

Video-Audio Media]. 2014(84):e51297.

16. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.

17. Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. *Chem Res Toxicol.* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. 1996 Jul-Aug;9(5):821-7.

18. Du L, Tang H, Ma Z, Xu J, Gao W, Chen J, et al. The protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Oct;56(10):2810-7.

19. Ruysers NE, De Winter BY, De Man JG, Ruysers ND, Van Gils AJ, Loukas A, et al. *Schistosoma mansoni* proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Feb 14;16(6):703-12.
20. Ostwald TJ, MacLennan DH. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1974 Feb 10;249(3):974-9.
21. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 1999 Dec 1;344 Pt 2:281-92.
22. Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2002 Nov-Dec;32(5-6):269-78.
23. Mendlovic F, Carrillo-Farga J, Torres J, Laclette JP, Flisser A. Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *J Parasitol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Aug;92(4):789-95.
24. Mendlovic F, Ostoa-Saloma P, Solis CF, Martinez-Ocana J, Flisser A, Laclette JP. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *J Parasitol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Aug;90(4):891-3.
25. Rzepecka J, Rausch S, Klotz C, Schnoller C, Kornprobst T, Hagen J, et al. Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Mol Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Mar;46(6):1109-19.
26. Xiang Y, Lu YH, Song M, Wang Y, Xu W, Wu L, et al. Overexpression of a *Triticum aestivum* Calreticulin gene (TaCRT1) Improves Salinity Tolerance in Tobacco. *PLoS One*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015;10(10):e0140591.
27. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2015 Oct-Dec;766:20-31.

28. Kelly RS, Roulland S, Morgado E, Sungalee S, Jouve N, Tumino R, et al. Determinants of the t(14;18) translocation and their role in t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Cancer Causes Control*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015 Dec;26(12):1845-55.
29. Ramos-Remus C, Dorazco-Barragan G, Aceves-Avila FJ, Alcaraz-Lopez F, Fuentes-Ramirez F, Michel-Diaz J, et al. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. [Clinical Trial Randomized Controlled Trial]. 2002 Mar-Apr;20(2):208-12.
30. Klaassen LJCJDCD. Casarett and Doulls toxicology: the basic science of poisons. 7th ed2008.
31. Richardson C, Yan S, Vestal CG. Oxidative stress, bone marrow failure, and genome instability in hematopoietic stem cells. *Int J Mol Sci*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2015;16(2):2366-85.
32. Laval J, Boiteux S, O'Connor TR. Physiological properties and repair of apurinic/apyrimidinic sites and imidazole ring-opened guanines in DNA. *Mutat Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 1990 Nov-Dec;233(1-2):73-9.
33. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1988 Mar;175(1):184-91.
34. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975 Feb;31(1):9-15.
35. Witt KL, Livanos E, Kissling GE, Torous DK, Caspary W, Tice RR, et al. Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals. *Mutat Res*. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural]. 2008 Jan 8;649(1-2):101-13.
36. Jyoti S, Naz F, Rahul, Khan S, Ali F, Fatima A, et al. Detection of aneugenicity and clastogenicity in buccal epithelial cells of pan masala and gutkha users by pan-

centromeric FISH analysis. *Mutagenesis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015 Mar;30(2):263-7.

37. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. [Comment Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Jan 10;534(1-2):65-75.

38. Heddle JA, Fenech M, Hayashi M, MacGregor JT. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*. [Historical Article]. 2011 Jan;26(1):3-10.

39. Dertinger SD, Torous DK, Hayashi M, MacGregor JT. Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage. *Mutagenesis*. [Review]. 2011 Jan;26(1):139-45.

40. Salazar AM, Mendlovic F, Cruz-Rivera M, Chavez-Talavera O, Sordo M, Avila G, et al. Genotoxicity induced by *Taenia solium* and its reduction by immunization with calreticulin in a hamster model of taeniosis. *Environ Mol Mutagen*. 2013 Jun;54(5):347-53.

41. Odagiri Y, Uchida H. Influence of serum micronutrients on the incidence of kinetochore-positive or -negative micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1998 Jul 8;415(1-2):35-45.

42. Zuniga-Gonzalez G, Ramirez-Munoz MP, Torres-Bugarin O, Perez-Jimenez J, Ramos-Mora A, Zamora-Perez A, et al. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutat Res*. 1998 Mar 16;413(2):187-9.

43. Song YF, Gong P, Wilke BM, Zhang W, Song XY, Sun TH, et al. Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. *J Environ Monit*. 2007 Feb;9(2):182-6.

44. Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM, Sciutto A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat Toxicol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Jun 1;78 Suppl 1:S93-8.

45. Wakata A, Miyamae Y, Sato S, Suzuki T, Morita T, Asano N, et al. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the

Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group. Environ Mol Mutagen. 1998;32(1):84-100.

46. Bernadette R. Atlas de Hematología Clínica. 4ta, editor2015.

47. Balmus G, Karp NA, Ng BL, Jackson SP, Adams DJ, McIntyre RE. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. Nat Protoc. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015 Jan;10(1):205-15.

48. B L. Genes VII. 2000(2a).

49. Liu L, Liu Y, Ni G, Liu S. Flow cytometric scoring of micronucleated reticulocytes as a possible high-throughput radiation biodosimeter. Environ Mol Mutagen. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Apr;51(3):215-21.

50. Fonseca-Coronado S, Ruiz-Tovar K, Perez-Tapia M, Mendlovic F, Flisser A. *Taenia solium*: immune response against oral or systemic immunization with purified recombinant calreticulin in mice. Exp Parasitol. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jan;127(1):313-7.

51. Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, Mendlovic F, Romero-Valdovinos M, Vaughan G, Salazar AM, et al. Immunological mechanisms involved in the protection against intestinal taeniosis elicited by oral immunization with *Taenia solium* calreticulin. Exp Parasitol. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Nov;132(3):334-40.

52. Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. J Biol Chem. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Apr 15;280(15):14981-8.

53. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. In: Mexicana NO, editor.1999.

54. Ruysers NE, De Winter BY, De Man JG, Loukas A, Pearson MS, Weinstock JV, et al. Therapeutic potential of helminth soluble proteins in TNBS-induced colitis in mice. Inflamm Bowel Dis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Apr;15(4):491-500.

55. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutat Res. [Consensus Development Conference

Review]. 1994 Jun;312(3):293-304.

56. Kunugita N, Isse T, Oyama T, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, et al. Increased frequencies of micronucleated reticulocytes and T-cell receptor mutation in Aldh2 knockout mice exposed to acetaldehyde. *J Toxicol Sci.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Feb;33(1):31-6.
57. Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodriguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition.* [Clinical Trial Randomized Controlled Trial]. 2003 Oct;19(10):837-42.
58. Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 1992;13(2):169-81.
59. Rostami A, Moosavi SA, Dianat Moghadam H, Bolookat ER. Micronuclei Assessment of The Radioprotective Effects of Melatonin and Vitamin C in Human Lymphocytes. *Cell J.* 2016 Spring;18(1):46-51.
60. Sener G, Aksoy H, Sehirli O, Yuksel M, Aral C, Gedik N, et al. Erdosteine prevents colonic inflammation through its antioxidant and free radical scavenging activities. *Dig Dis Sci.* 2007 Sep;52(9):2122-32.
61. Pilichos CJ, Kouerinis IA, Zografos GC, Korkolis DP, Preza AA, Gazouli M, et al. The effect of nitric oxide synthases inhibitors on inflammatory bowel disease in a rat model. *In Vivo.* 2004 Jul-Aug;18(4):513-6.
62. Liu H, Bowes RC, 3rd, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 Aug 29;272(35):21751-9.
63. Mendlovic F, Cruz-Rivera M, Avila G, Vaughan G, Flisser A. Cytokine, antibody and proliferative cellular responses elicited by *Taenia solium* calreticulin upon experimental infection in hamsters. *PLoS One.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2015;10(3):e0121321.

64. LeBaron MJ, Schisler MR, Torous DK, Dertinger SD, Gollapudi BB. Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test. *Environ Mol Mutagen*. 2013 Apr;54(3):222-8.
65. Torous D, Asano N, Tometsko C, Sugunan S, Dertinger S, Morita T, et al. Performance of flow cytometric analysis for the micronucleus assay--a reconstruction model using serial dilutions of malaria-infected cells with normal mouse peripheral blood. *Mutagenesis*. 2006 Jan;21(1):11-3.
66. Kasamoto S, Mukai D, Masumori S, Suzuki K, Tanaka R, Torous DK, et al. Flow cytometric analysis of micronuclei in rat peripheral blood: An interlaboratory reproducibility study. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014 Mar 01;762:39-42.
67. Torous DK, Hall NE, Illi-Love AH, Diehl MS, Cederbrant K, Sandelin K, et al. Interlaboratory validation of a CD71-based flow cytometric method (Microflow) for the scoring of micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood. *Environ Mol Mutagen*. [Multicenter Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Validation Studies]. 2005;45(1):44-55.
68. Abraira V. Desviación estándar y error estándar. *SEMERGEN*. 2002;11(28):621-3.
69. Sincich JTMaT, editor. *Statistics*. 10 th ed2006.
70. Martínez Ortega RM, Tuya Pendás LC, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A, Cánovas AM. EL COEFICIENTE DE CORRELACION DE LOS RANGOS DE SPEARMAN CARACTERIZACION. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2009;8:0-.