BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE LA VACUNA S3Pvac A TRAVÉS DE LA ELECTROFORESIS DE CÉLULAS INDIVIDUALES

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

PRESENTA:

JANET JERÓNIMO GONZÁLEZ.

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MA. TERESA ABAD CAMACHO

M.C. JUAN CARLOS BENÍTEZ SERRANO

DICIEMBRE 2015

1 ÍNDICE

2 RESUMEN 4

3 INTRODUCCIÓN 5

4 ANTECEDENTES 6

3.1 Antecedentes Generales 6

3.2 Cisticercosis en México 6

3.3 Epidemiología 7

3.4 Cisticercosis 8

3.5 Neurocisticercosis 9

3.6 Agente Etiológico. 10

3.6.1 Taenia solium; Cisticerco 10

3.7 Ciclo de Vida 11

3.8 Tratamiento 12

3.9 Vacunas. 13

3.10 Estructura y función del ADN. 15

3.11 daños en el ADN: mutaciones. 17

3.12 Pruebas para la detección de daño en el ADN 17

4 ANTECEDENTES ESPECIFICOS. 18

4.1 Electroforesis Alcalina de Células Única. 18

4.2 VACUNA S3P-vac 23

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 25

6 PREGUNTA CIENTIFICA 26

7 JUSTIFICACIÓN 26

8 HIPOTESIS 27

8.1 Alternativa: 27

8.2 Nula: 27

9 OBJETIVOS 27

8.1 Objetivo general: 27

9.2 Objetivos particulares: 27

10 DISEÑO DEL ESTUDIO 27

11 MATERIALES Y MÉTODOS 28

11.1 Diagrama de trabajo 28

11.2 Animales de experimentación. 28

11.3 Bioética: 29

11.4 Tratamiento: 29

12 EVALUACIÓN DE LA GENOTÓXICIDAD DE LA VACUNA S3P-VAC A TRAVÉS DE LA ELECTROFORESIS DE GELES EN CÉLULA ÚNICA. 29

12.1 PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS CON CUBIERTOS DE AGAROSA PUNTO DE FUSIÓN NORMAL (NMA) AL 1% 29
12.2 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA: 30
12.3 LISIS DE MEMBRANAS CELULARES. 30
12.4 BUFFER DE ELECTROFORESIS. 30
12.5 NEUTRALIZACIÓN. 30
12.6 TINCIÓN. 31
12.7 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y ANÁLISIS DE IMAGEN. 31
12.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO. 31

13 RESULTADOS 32

14 IMÁGENES DE COMETAS DE ACUERDO A LA CLASIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE DAÑO DE ACUERDO A LA ESCALA DE SPEITT Y COLLINS. 44

15 DISCUSIÓN DE RESULTADOS 46

16 CONCLUSIONES 50

17 BIBLIOGRAFÍA 51

18 ANEXOS 57

2 RESUMEN

La vacuna S3P-vac contra la cisticercosis porcina se constituye por tres péptidos de la estructura antigénica del cisticerco de diferentes especies de *Taenias*; se obtiene a partir de plantas transgénicas.

La cisticercosis es una enfermedad causada por la fase larvaria de *T. solium*: el cisticerco, quien afecta al humano y al cerdo, siendo el primero quien aloja la *Taenia* intestinal y el cerdo el huésped intermediario. Es un problema de salud que afecta a países subdesarrollados como México y Brasil, zonas de Latinoamérica donde se registra la mayor incidencia de cisticercosis.

S3P-vac ha demostrado ser una vacuna eficiente al brindar protección inmunológica; sin embargo, en un estudio previo (Mondragòn 2010) se encontraron diferencias significativas, al aumentar la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de roedor, a las 72 h, por tal motivo surge la necesidad de determinar si existe o no algún efecto genotóxico a través de la administración de la vacuna en modelo murino utilizando la electroforesis de células individuales también conocida como ensayo cometa.

El ensayo cometa, consiste en someter a las células a una electroforesis, bajo un pH >13, y en caso de que el material genético haya sufra algún daño, el ADN queda de manifiesto mediante una cauda, tomando la apariencia de ser un cometa.

Tras la evaluación de S3P-vac se determinó que la vacuna S3P-vac causa un aumento en la frecuencia de células en forma de cometa; la concentración que presentó el mayor daño fue de 10 μg/kg a las 48 h con 17.53 % de células con daño total, sin embargo el porcentaje de células dañadas está por debajo del 20% que es aceptado como límite de acuerdo a lo reportado por Arenciba F. (2007). Con las concentraciones de 20 y 30 μg/kg de S3P-vac el porcentaje de células con daño total es menor al 5 %.

3 INTRODUCCIÓN

La cisticercosis, es un problema de salud que ha acompañado al hombre a lo largo del tiempo y ha estado relacionada con la mortalidad y morbilidad de la población, principalmente de países tercer mundistas, aunque debido a la migración se ha convertido en una enfermedad reemergente en países de primer mundo.

Debido a que la cisticercosis no solo representa un problema de salud para el hombre, sino que además también implica pérdidas económicas al sector agropecuario diversos investigadores se han dedicado a encontrar una posible solución a este problema. Ha surgido como una posible respuesta al identificar, aislar y producir antígenos con capacidad protectora contra la cisticercosis porcina, para así interrumpir el ciclo de transmisión del parasito. Los resultados obtenidos con la vacunación han sido favorables ya que después de la infección natural se produce inmunidad protectora a través de antígenos que fueron obtenidos de extractos oncosferales; estos antígenos además han demostrado reducir la tasa de infección y la carga parasitaria.

De los diversos candidatos que han surgido solo uno ha sido probado en México bajo las drásticas condiciones en las cuales suele presentarse la enfermedad en las zonas rurales, su nombre es la vacuna S3P-vac.

S3P-vac se constituye por tres péptidos protectores que surgieron del estudio de la estructura antigénica del cisticerco de diferentes especies de *Taenias*; su producción se lleva a cabo a través de plantas transgénicas con lo que se pretende favorecer la vía de administración oral.

Sin embargo, y pese a los resultados favorables que se han obtenido, en el país no se cuenta con estudios que avalen la bioseguridad de S3P-vac por este motivo surge la necesidad de determinar si existe o no algún efecto genotóxico a través de la administración de la vacuna en modelo murino utilizando la electroforesis de células individuales también conocida como ensayo cometa.

4 ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes Generales

La cisticercosis es un problema de salud que ha estado presente a lo largo de la historia del hombre, ya que hay registros de la enfermedad en civilizaciones tan antiguas como los egipcios, griego y romanos.

El primer registro de cisticercosis humana data del año 1558, descrito por Rumler, con un paciente epiléptico. Para 1853 Van Beneden demostró que al alimentar un cerdo con los huevos de *Taenia solium* el animal desarrollaba la enfermedad, encontrándose cisticercos en músculo. En 1855 se demostró que la teniasis se desarrolló a partir de cisticercos, ya que Kuchenmeister alimentó a un convicto con cisticercos extraídos de carne de cerdo, recuperando después las tenias en el intestino al realizar la autopsia.

Zeder y Rudolphi dieron al cisticerco la denominación genérica de *Cysticercus cellulosae*, pero cuando se demostró que el cisticerco solo es un estadio larvario de *Taenia solium*, el nombre fue desechado *(Larralde, 2006) (Resendiz, 2010).*

3.2 Cisticercosis en México

En México el primer trabajo sobre cisticercosis lo realizó el veterinario José de la Luz Gómez en el año 1889, él público en la gaceta médica oficial de la academia Nacional de Medicina los datos obtenidos de una tocinería, en la cual encontró una frecuencia de 2.4 % y 2.9 % entre los años de 1888 y 1889 *(Larralde, 2006).* Durante el siglo XX se empezó a prestar mayor atención a esta parasitosis debido a un aumento en los casos de Neurocisticercosis (NC) *(Aluja, 2000).*

El primer reporte de cisticercosis humana en México apareció en 1901 y fue reportado por el Dr. Ignacio Gómez Izquierdo; quién describió el caso de una paciente cubana de un asilo psiquiátrico, que murió con diagnóstico de alcoholismo o tuberculosis, y sin embargo en su autopsia se encontraron cisticercos *(Larralde, 2006).*

En comparación con los datos de hace cincuenta años no se han encontrado variaciones a pesar de que a comienzos de siglo XX los casos de cisticercosis disminuyeron a tal punto de casi ser erradicada en países de Europa y Estados Unidos, ya que se empezaron a tomar en cuenta algunos factores como la

inspección de rastros, la tecnificación de la porcicultura y en general el mejoramiento de medidas de higiene y sanidad tanto de manera personal como comunitaria. Lamentablemente la migración ha vuelto a propiciar la aparición de la enfermedad en zonas donde ya había sido erradicada *(Larralde, 2006).*

3.3 Epidemiología

El papel que juega la cisticercosis como problema de salud, se presenta principalmente en países donde la carne de cerdo representa la principal fuente de proteína *(Tay, 2010).* Esta enfermedad afecta a países subdesarrollados como México y Brasil que son las zonas de Latinoamérica donde se registra la mayor incidencia de cisticercosis; siendo una enfermedad reemergente en países como E.U.A. debido a la migración de los portadores de *T. solium (Larralde, 2006).*

La cisticercosis se relaciona directamente con deficiencia en las medidas de higiene y las condiciones inadecuadas en las que se mantiene a los cerdos; ya que están en contacto con excretas humanas contaminadas con huevos de *T. solium.* Del total de los cerdos en el país el 60 % son de granja y están en confinamiento estricto, en espacios reducidos y sin contacto con la tierra, aguas fluviales o estancadas. Los animales restantes van del 30 al 40 % corresponden a los llamados cerdos de traspatios, que viven en patios o solares; y también se encuentran los denominados cerdos rústicos, que pasan la mayor parte del tiempo libre deambulando en las calles de las comunidades rurales, las cuales generalmente carecen de buenas prácticas higiénicas, ya que aún practican la defecación al aire libre *(Larralde, 2006).*

En el año 2008 el total de casos en México con reporte de cisticercosis fue de 296, siendo el estado de Jalisco el que presentó la mayoría de los casos; mientras que el estado de Puebla tuvo 2.7 % del total de los casos *(Fuentes, 2011).*

Se ha comprobado que el contacto con un portador de *T. solium* es el principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis, por lo cual los programas de salud deberían estar enfocados al diagnóstico y tratamiento de la teniasis; previniendo así contraer cisticercosis a través del contacto de personas con teniasis que representan un foco de infección *(Larralde, 2006).*

La razón por la que los cerdos se dejan sin vigilancia, y consumen material fecal humana es por las condiciones de marginación que se presentan en este tipo de comunidades, ya que el alimento que poseen apenas es suficiente para la familia y es debido a esto que posiblemente los animales no tengan

la alimentación adecuada; sin embargo tampoco es posible deshacerse de los animales porque representan una inversión.

La disponibilidad de materia fecal humana para los cerdos rústicos es variable dependiendo de la época del año en la que se encuentre, durante la temporada de sequía se ha observado que es mayor la disponibilidad *(Larralde, 2006)*

En el estado de Puebla la frecuencia de cisticercosis reportada por la bibliografía va del 13 al 14*%(Martinez, et al. 1997l) (Huerta, et al. 2001).*

Los datos con respecto a la presencia de Neurocisticercosis (NC), reportan que cerca de 50 millones de personas en el mundo la padecen, de los cuales 50 mil mueren al año por esta enfermedad *(Fuentes, 2011) (Flisser, 2001).*

3.4 Cisticercosis

La cisticercosis es una enfermedad causada por la ingesta de huevos de *T. solium*, que afecta por igual al humano, quien aloja la *Taenia* intestinal; y al cerdo que es el principal huésped intermediario, ya que en él se aloja la larva. Este metacéstodo posee una gran capacidad de invasión en tejidos como músculo esquelético, tejido subcutáneo y músculo cardíaco *(Walteros, 2009).* De acuerdo con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se tiene un reporte de 55 casos de cisticercosis al año *(Resendiz, 2010).*

La transmisión de la enfermedad depende directamente de la convivencia del huésped definitivo de *T. solium* con el huésped intermediario, ya que el portador de la *Taenia* intestinal será un foco de infección latente al estar excretando huevos de *T. solium*, y será una fuente de infección tanto para cerdos como para humanos; e incluso para él mismo siendo un candidato potencial para desarrollar cisticercosis *(Larralde, 2006).*

La cisticercosis representa un serio problema de salud ya que tiene severas consecuencias sobre la salud del paciente, principalmente la desnutrición presente en los pacientes con teniasis; debido a la mala absorción de nutrientes, afectando así el desarrollo del individuo

El cisticerco posee la capacidad de atacar por igual a animales domésticos y salvajes; y dependiendo de la especie de *Taenia* serán los sistemas principalmente afectados ya que los metacéstodos de *T.*

saginata que causa la cisticercosis bovina ataca principalmente músculo; *T. solium* causante de la cisticercosis porcina y humana tiene afinidad por músculo, sistema nervioso central e hígado. Otra especie de *Taenia* que ataca al cerdo es *T. asiática* que se hospeda principalmente en hígado y demás vísceras.

Otros animales afectados por la cisticercosis son las ovejas y cabras en las cuales la enfermedad es denominada cenurosis, debida a *T. ovis*, *T. multiceps* y *T. hydatigena*, con afinidad por músculo, cerebro, hígado y cavidad peritoneal *(Walteros, 2009).*

3.5 Neurocisticercosis

La complicación más severa de la cisticercosis se presenta cuando la larva se aloja en Sistema Nervioso Central (SNC), provocando NC, que se caracteriza por sintomatología pleomórfica, por sus manifestaciones clínicas inespecíficas. Siendo los ataques epilépticos el signo característico. La sintomatología de la enfermedad dependerá de algunos factores como el número de cisticercos, localización, grado de desarrollo y tipo e intensidad de respuesta inmune que presente el huésped *(Corredor, et al. 2009).*

Los ataques epilépticos son un signo característico cuando los cisticercos se alojan en el parénquima cerebral. Cuando su ubicación es extra-parenquimatosa pueden llegar a causar hidrocefalia, debido a la obstrucción mecánica de los ventrículos o de las cisternas basales, ya sea por la presencia de los parásitos o por una reacción inflamatoria. Los cisticercos racemosos llegan a causar algunas manifestaciones como compresión tisular, hidrocefalia, meningitis, aracnoiditis y efecto de masa; todo esto debido a su crecimiento. Estos síntomas pueden mejorar al colocar una válvula que drene el líquido cefalorraquídeo de los ventrículos al peritoneo *(Larralde, 2006) (Walteros, 2009).*

La NC puede presentar diferentes etapas y dependiendo de esto será la respuesta que genere. La etapa encefalítica se asocia a una reacción inflamatoria focal con edema cerebral local; la cual puede dar consecuencias como dolor de cabeza, o crisis convulsivas focales. La etapa quística es causada por cisticercos viables, que evadieron la respuesta inmune del hospedero, tiene una pared vesicular delgada, transparente y contiene fluido. La etapa de degeneración es cuando el parásito pierde control sobre la respuesta inmune o sobre el efecto del tratamiento cestocida, aquí el parásito posee membrana hialinizada, pierde viabilidad, engrosa su tegumento, el fluido vesicular se vuelve viscoso y el proceso

inflamatorio se aumenta hasta que se genera la calcificación (granuloma terminal) *(Corredor, et al. 2009).*

3.6 Agente Etiológico

3.6.1 *Taenia solium*; Cisticerco

Taenia solium es un parásito metazoario, plano con la apariencia de una cinta, plana, larga y blanquesina; tiene simetría bilateral, sin cavidad celómica; que posee tejido conectivo parenquimatoso en el cual se encuentran inmersos sus órganos internos. Es hermafrodita y posee un cuerpo segmentado, que puede llegar a medir de 2 a 4 m *(Corredor, et al. 2009).*

El parasito adulto se forma por un escólex o cabeza en la que se encuentran los órganos de fijación, la doble corona de ganchos y cuatro ventosas. Solo *T. solium* posee corona de ganchos porque *T. saginata* carece de ella. El escólex se va adelgazando formando un cuello a partir del cual se generan los proglótidos o segmentos. Conforme más cerca estén los proglótidos del cuello son más jóvenes e indiferenciados. Los proglótidos más alejados son maduros y en ellos se encuentran los órganos sexuales, los órganos masculinos son los primeros en desarrollarse y se forman por varios testículos que poseen un gran número de espermatozoides filiformes es decir que no tienen cabeza. Los órganos femeninos se forman por un ovario trilobulado, que está en el extremo posterior del proglótido. En el útero se observan ramas uterinas; característica que sirve como criterio de diferenciación entre *T. solium* y *T. saginata*, ya que en la primera el número de ramas es menor a 12, mientras que en la segunda va de 12 a 30 ramas *(Tay, 2010).*

Los proglótidos grávidos son los que contienen los huevos que han sido fecundados; cada proglótido tiene alrededor de 60,000 huevos. Generalmente el tamaño de los proglótidos es variable, los indiferenciados no tienen un tamaño definido, mientras que los proglótidos maduros y grávidos, pueden medir entre 7-12 mm de largo por 5-6 mm de ancho.

Una vez que *T. solium* se fija a la mucosa intestinal a través del escólex, la alimentación del parásito se da por medio de la cutícula, que se encarga de la absorción de los metabolitos.

Los proglótidos grávidos son eliminados junto con la materia fecal, y posteriormente pueden ser ingeridos por los cerdos, al llegar al estómago se lisan, liberando los huevos que aproximadamente miden 40 µm de diámetro y están formados por tres capas: el vitelo o cápsula es la más externa; luego está el embrioforo que es la capa que confiere la protección a la larva, formada por bloques proteicos y

que dan la apariencia estriada; la última capa es la membrana oncosferal que rodea directamente al embrión hexacanto; los huevos de *T. solium* son parecidos en morfología a los de las demás especies de *Taenia sp (Larralde, 2006) (Tay, 2010) (Corredor, et al. 2009).*

El cisticerco es la forma larvaria de *T. solium* tiene forma vesicular y blanquecina. Está formado por una membrana, llena de líquido vesicular que contiene proteínas, carbohidratos y lípidos; mide de 0.5 a 2 cm. Posee un escólex invaginado que al igual que *T. solium* también tiene la doble corona de ganchos y las cuatro ventosas. Su superficie más externa que es la que entra en contacto directo con el huésped, es un tegumento citoplásmico, sincicial y continúo.

El metacéstodo obtiene sus nutrientes a través de difusión facilitada por medio de la pared vesicular, en la que se han encontrado dos transportadores de glucosa TGTP1 y TGTP2, y puede adaptarse a condiciones de aerobiosis o anaerobiosis dependiendo de la disponibilidad de oxígeno que tenga.

En su superficie han sido identificadas diferentes glicoproteínas, e incluso inmunoglobulinas del huésped; además de ciertas proteínas que sintetiza bajo condiciones de estrés por temperatura como HSP 80, HSP 70 y HSP 60.

El cisticerco puede presentarse de dos formas: racemoso, que es el de mayor tamaño, presenta varias lobulaciones y tiene una membrana irregular ya que presenta adelgazamientos y zonas donde se engrosa, carece de escólex y se puede llegar a encontrar en cavidades ventriculares y en la base del cerebro, generalmente es la forma observada en la NC humana. La forma celulosa es la más pequeña y se describe como una vesícula traslucida, a través de la cual se observa el escólex *(Larralde, 2006) (Corredor, et al. 2009).*

3.7 Ciclo de Vida

La cisticercosis puede ser adquirida por diversos mecanismos, dentro de los que se encuentran:

- Heteroinfección: El hospedero consume los huevos eliminados por otro individuo. Generalmente el consumo se da por fómites o alimentos contaminados con los huevos de *T. solium*.
- Autoinfección externa: Causada generalmente por malos hábitos higiénicos. La infección es causada cuando el individuo consume huevos que él mismo elimina. Se da por el mecanismo mano-ano-boca.

- Autoinfección Interna: El paciente aloja al parásito adulto y por movimientos antiperistálticos, los proglótidos y huevos llegan al estómago o duodeno en donde eclosionan y la oncosfera penetra la mucosa intestinal, y llega a tejidos donde se aloja.
- El otro mecanismo es el consumo de carne de cerdo contaminada con oncosferas viables, generando la cisticercosis en el humano.

El ciclo de vida del parasito depende directamente de quién ingiera la forma infectante y se puede dar de las siguientes formas: cuando el humano o el cerdo consumen la forma infectante: el cisticerco; desarrollarán teniasis; o bien cuando alguno de los dos huéspedes ingieren el huevo, se desarrollará cisticercosis.

La vida del parásito alterna entre el humano (huésped definitivo) y el cerdo (principal huésped intermediario) ya que de forma natural el platelminto en su forma adulta solo se encuentra en el intestino humano (*Tay, 2010).*

El ciclo de vida del parásito, en el cerdo comienza cuando el animal consume materia fecal humana contaminada con huevos de *T. solium*, que al llegar al tubo digestivo, por acción de las sales biliares y de enzimas proteolíticas pierde su envoltura liberando al embrión hexacanto u oncosfera; promoviendo así su activación; posteriormente las oncosferas activas atraviesan la mucosa intestinal, perdiendo sus ganchos. A través de capilares sanguíneos o linfáticos las oncosferas son distribuidas a los sitios donde pueden llegar a instalarse como musculo esquelético, tejido subcutáneo, musculo cardiaco, ojos, encéfalo y en menor cantidad a vísceras; y aproximadamente en un periodo de diez semanas, el parásito pase al siguiente estadio, que es el cisticerco. El cual puede sobrevivir durante años alojado en el huésped intermediario.

Cuando el humano ingiere carne de cerdo mal cocida y contaminada con los cisticercos, estos llegan al estomago donde se libera el escólex y se fija a la pared intestinal; instalándose en ella y desarrollándose el parásito adulto que excretará proglótidos grávidos el cual contiene miles de huevos que serán liberados al ambiente *(Larralde, 2006).*

3.8 Tratamiento

Hay diversos tipos de tratamiento contra cisticercosis, dependiendo de quién padezca la enfermedad (el cerdo o el humano). En el caso de la cisticercosis porcina existe una gran variedad de

fármacos para combatirla, como por ejemplo fluobendazol, praziquantel, sulfoxido de albendazol y oxfendazol *(Aluja, 2000) (Corredor, et al. 2009).*

En caso del tratamiento de la cisticercosis humana, se toma en consideración la NOM-021-SSA2-1994, para la prevención y control del binomio teniasis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica. El medicamento de elección contra la teniasis en pacientes menores de 5 años, es albendazol en suspensión o tabletas, en dosis de 20 ml/día, por tres días; o en caso de ser tabletas son 400 mg/día, durante tres días.

Para personas adultas el fármaco de elección cambia y se recomienda el uso de prazinquantel, en dosis de 10 mg/kg de peso como dosis única; teniendo como dosis máxima 600 mg/ kg de peso y para el caso de la NC humana se puede emplear el tratamiento anteriormente mencionado, además de niclosamida *(Corredor, et al. 2009).* Después de tres meses con el tratamiento se sugiere realizar estudios de laboratorio; donde el objetivo principal será verificar que no haya presencia de huevos de *T. solium* haciendo uso de técnicas como Kato-katz, Graham y Faust *(NOM-021-SSA2-1994).*

Aunque las medidas profilácticas contra la cisticercosis son variadas no son suficientes ya que en la mayoría de los casos los pacientes desconocen ser portadores del parasito y por tanto no tienen el tratamiento farmacológico adecuado para tratar la enfermedad. Sin embargo la educación y concientización de los riesgos que la enfermedad representa para la salud del hombre y las pérdidas que genera al sector agropecuario son de gran importancia; así como enfatizar en la correcta cocción de los alimentos y evitar el fecalismo al ras del suelo *(NOM-021-SSA2-1994).*

En los últimos años gracias al avance de la biotecnología, se tienen nuevas propuestas para combatir la enfermedad, desde un enfoque diferente ya que su objetivo es frenar la enfermedad, interrumpiendo la transmisión de la forma infectante a través de la vacunación de cerdos. Dentro de las vacunas utilizadas contra cisticercosis destacan los resultados obtenidos con proteínas definidas, péptidos sintéticos, fagos recombinantes y plásmidos de DNA. Sin embargo, aún existen factores limitantes *(Uribarren, 2011).*

3.9 Vacunas

La respuesta inmune es algo fundamental para la supervivencia, debido a que sin esta protección no sería posible enfrentar los peligros del entorno, por tal motivo es que contamos con ella desde que nos encontramos en el vientre materno *(Blanco, 2009).*

Durante los primeros meses de vida el sistema inmune no está lo suficientemente desarrollado para brindar una adecuada protección, por tanto la inmunidad se da a través de anticuerpos IgG, sin embargo conforme el sistema inmunitario va madurando se van adquiriendo formas ajenas con las cuales también se obtiene protección *(Roitt, et al. 2006).*

Una eficaz manera de conseguir protección inmunológica es a través de una vacuna, que se define como una suspensión formada por microorganismos, ya sea que estén vivos, atenuados o incluso pueden contener solo partes antigénicas de estos. Su principal objetivo es proporcionar una respuesta inmune efectiva, ya que debe brindar una adecuada cantidad de anticuerpos, además de ser capaz de generar células de memoria que ante un nuevo contacto con el antígeno sean capaces de expandirse.

Sin embargo una respuesta inmune efectiva no es suficiente para que una sustancia pueda emplearse como vacuna; hay otras características con las cuales debe de cumplir como por ejemplo ser de bajo costo, la preparación debe ser estable, segura y los antígenos deben ser de fácil obtención *(Blanco, 2009) (Roitt, et al. 2006).*

Las primeras vacunas surgieron de forma empírica a través de la observación, al ver que una infección de viruela dejaba al individuo protegido contra infecciones subsecuentes, de esta forma empezaron a emplear pus seca como inoculo, administrándolo generalmente en mucosas, logrando así una forma de protección. Fue hasta el año de 1798, cuando Edward Jenner publicó su trabajo sobre la vacunación con el virus de la viruela, a partir de lo cual surge el nacimiento de la inmunología *(Blanco, 2009).*

Por otro lado, los términos de vacunación e inmunización han sido erróneamente utilizados, ya que en ocasiones son utilizados como sinónimos, pero no es así. La vacunación es la administración de una sustancia que causará una respuesta inmune, que bien puede ser un toxoide o una vacuna; y la inmunización es la acción de estos para inducir o producir esa respuesta inmune.

Dependiendo de cómo sea generada la respuesta inmune, existen dos tipos: La inmunización activa, que es la creación de anticuerpos, formados por la administración de antígenos (vacunas o toxoides) y la inmunización pasiva, que se da de forma temporal, por la administración de globulinas exógenas producidas por humanos o animales.

La inmunidad que se adquiere mediante microorganismos vivos es la más efectiva, aunque también es donde se presentan mayores riesgos y reactogenicidad *(Blanco, 2009).*

Hay diversos factores por medio de los cuales se pueden clasificar las vacunas, de acuerdo a su composición, a su forma de fabricación y a la utilización que se les da. De acuerdo a la clasificación con base a su composición, las vacunas pueden clasificarse en dos tipos: Vacunas vivas o atenuadas y Vacunas Inactivadas. Las primeras requieren un procesamiento denominado método de atenuación, el cual no solo se puede obtener por la modificación del microorganismo, sino que también se puede obtener cuando se hace uso de cepas heterólogas virulentas para otras especies pero no para el humano, aunque a través de la historia la atenuación se ha dado de diversas formas.

Una nueva posibilidad para la obtención de vacunas es por medio de ADN recombinante, ya que se producen genes que codificarán para una parte de la cadena o bien para una proteína, expresándolos en un vector.

Este tipo de tecnologías presentan grandes ventajas, como por ejemplo la disminución de costos, pero también implican un gran reto porque para un funcionamiento adecuado se deben de cumplir ciertas características como por ejemplo: buscar el vector de expresión adecuado, la obtención del plegamiento correcto de la cadena peptídica ya que de esto dependerá que se obtenga una proteína activa, otro factor a considerar es el de hacer la separación del producto sin ocasionar la desnaturalización *(Blanco, 2009) (Roitt, et al. 2006).*

3.10 Estructura y función del ADN

La base de un buen funcionamiento celular depende primeramente de la integridad y el correcto funcionamiento del ADN, ya que esta molécula presente en la estructura nuclear de las células tiene la capacidad de almacenar, replicar, transmitir y decodificar la información genética.

El ADN está compuesto de cuatro bases nitrogenadas diferentes adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T), que junto con el grupo fosfato y el azúcar pentosa, forman lo que es la base estructural del ADN: los nucleótidos.

Es bien sabido que la molécula de ADN es susceptible a daños causados por diversos agentes como compuestos químicos, agentes físicos o biológicos, pero que posee diversos mecanismos con la capacidad de reparar y preservar la integridad de la molécula.

La vulnerabilidad del ADN frente a reacciones de hidrolisis química o enzimática, se encuentra en el enlace 3’-5’ fosfodiéster, pudiendo generar dos productos el fosfonucleósido 5’ o su isómero 3’,

dependiendo del lugar de la ruptura; además de ser un sitio susceptible a hidrolisis el enlace fosfodiester, la rotación de la molécula también se centra en él y en el enlace glucosídico que se da entre la base y el azúcar.

Una característica fundamental en la molécula de ADN es la capacidad que tiene para desenrollarse y volverse a juntar, lo cual tiene un gran papel en mecanismos como la replicación y la transcripción, en donde además también es primordial la complementariedad de las bases *(Solari, 2007).*

Para que haya una separación del dúplex debe haber una ruptura de las cadenas, en específico de los enlaces por puentes de hidrógeno, esto se lleva a cabo de manera natural en procesos como la replicación donde la ruptura se realiza por medio de una enzima; pero también otros factores pueden alterar la estructura como son aumento de temperatura, o a través de álcalis o ácidos. La acción de los ácidos es que protonan el nitrógeno del anillo de A, G y C, mientras que los álcalis desprotonan el nitrógeno del anillos de G y T; aunque la desnaturalización se realiza mejor en condiciones básicas ya que a pH bajo hay poca labilidad de los *enlaces* glucósidicos *(Garrido, et al. 2006).*

Otro método usado para desnaturalizar el ADN es el calor, con lo cual se hace uso de reacciones hipercrómicas, que generan un aumento de absorbancia para determinar el punto de fusión, que es proporcional a la contenido de enlaces G-C; mientras mayor sea su presencia el punto de fusión será mayor.

El proceso de desnaturalización es reversible, y en ello la complementariedad de las cadenas juega nuevamente un papel de suma importancia; ya que al incubar cadenas complementarias a una temperatura menor a 25°C las cadenas empiezan nuevamente a unirse, formando una doble hélice. El proceso de renaturalización puede generarse aun cuando una de las hebras haya sufrido alguna modificación.

El ADN puede encontrarse en un cromosoma o dentro de un virus; aunque en las células eucariotas el ADN se encuentra unido a proteínas histónicas. Debido a la sensibilidad de la molécula es difícil obtener largas cadenas de ADN, sin embargo una vez realizada su extracción pueden verse moléculas de ADN con una longitud hasta de 50μ, haciendo uso del microscopio electrónico.

De forma natural el ADN se encuentra condensado en los cromosomas; y en el caso de los cromosomas eucarioticos además del ADN se encuentran proteínas histónicas, formando un complejo y una sola fibra de cromatina enrollada sobre sí misma *(Garrido, et al. 2006) (Fernández).*

3.11 Daños en el ADN: mutaciones

La importancia del ADN radica en que de algún modo es el instructivo para la formación de un nuevo organismo y de su buena funcionalidad depende la vida a nivel celular, dentro de sus principales funciones se pueden mencionar las siguientes: se encarga de almacenar, replicar, transmitir y decodificar la información genética.

Debido a que su buen funcionamiento es vital, las células poseen diversos mecanismos para evitar toda clase de errores; pero en ocasiones, estos mecanismos son rebasados por la cantidad de daño producido o bien son incapaces de corregir el error, con lo cual se generan cambios en la secuencia de ADN. Estos cambios en el ADN son denominados mutaciones, y son las responsables de producir muerte celular, enfermedades genéticas y cáncer *(Garrido, et al. 2006) (Klug, et al. 2006).*

Dependiendo del tamaño y el lugar en donde se presente la mutación será la clasificación empleada para denominarla; aquellas que se presentan en grandes regiones cromosómicas son denominadas mutaciones cromosómicas. Las que se dan a nivel de un gen específico son conocidas como mutaciones génicas *(Klug, et al. 2006).*

Cuando el daño es causado por agentes externos al metabolismo celular, principalmente por agentes químicos o por radiaciones se presentan las mutaciones inducidas. En algunos casos nos encontramos expuestos de manera natural, en el medio ambiente a este tipo de mutágenos, como las toxinas de algunos hongos, luz UV, rayos X, productos químicos *(Klug, et al. 2006).*

3.12 Pruebas para la detección de daño en el ADN

Debido a la fragilidad que posee el ADN contra sustancias externas, ha surgido la necesidad de desarrollar diversas técnicas enfocadas a poner de manifiesto el daño que una sustancia es capaz de causar a nivel celular, para ello se cuenta con diversas técnicas capaces de detectar la toxicidad que una sustancia es capaz de generar a la célula. Esta detección del daño puede hacerse a diversos niveles, se puede detectar la citotoxicidad generada o bien la genotóxicidad.

Dependiendo del tipo de daño y de su localización una sustancia posee la capacidad de causar daño en la síntesis de sustancias esenciales para el metabolismo celular, o dañar estructuras necesarias para la supervivencia de la célula.

Debido al gran impacto que el daño al ADN causa a los seres vivos es que hay diversos ensayos de bioseguridad que están enfocados de diferente forma ya que bien pueden ser ensayos realizados *in vivo* o *in vitro*; haciendo uso de diversos sistemas como por ejemplo: hongos, virus, bacterias, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos.

Algunos de estos ensayos son Micronúcleos, aberraciones cromosómicas y electroforesis de células individuales *(Arenciba, et al. 2011).*

4 ANTECEDENTES ESPECIFICOS

4.1 Electroforesis Alcalina de Células Única

Debido a la importancia que representa la integridad del ADN para nuestro bienestar, es que ha surgido la necesidad de desarrollar metodologías que sean capaces de detectar cualquier anomalía. Sin embargo son contadas las técnicas que tienen esta capacidad, especialmente si lo que se busca es conocer el daño celular de manera individual, enfocándose a diversas áreas como genética, toxicología, bioquímica o biología molecular.

Diversas pruebas han sido realizadas con este fin, una de ellas es la Electroforesis de células individuales o ensayo cometa. Se define como una técnica basada en métodos bioquímicos, que permite la identificación del daño que un determinado agente genotóxico es capaz de causar en el ADN, pudiéndolo estudiar de forma individual por célula. Su fundamento se basa en que a través de esta prueba se ponen de manifiesto rupturas de cadena simple, doble, sitos lábiles al álcali, daño oxidativo o entrecruzamiento ADN-proteína, ADN-ADN (Hernández C. 2001). Es a partir de la técnica de Singh 1988 que se empieza a conocer con el nombre de "Electroforesis de Geles en Células Individuales" (SCGE- Single Cell Gel Electrophoresis por sus siglas en inglés) *(Collins, et al. 2008) (Zuñiga, 2009).*

El ensayo cometa, consiste en someter a las células de interés a una electroforesis, bajo un determinado pH, y en caso de que el material genético haya sufrido algún daño, el ADN quedará de manifiesto por medio de una cauda, tomando la apariencia de ser un cometa; la cabeza formada por la célula y la cola que representa el material genético dañado *(Collins, et al. 2008).*

La formación de este cometa se ve favorecida bajo condiciones alcalinas, ya que se mejora el desenrollamiento del ADN, y gracias a la carga negativa de la molécula, el material genético migrará

hacia el ánodo al someterlo a la electroforesis, y solo en caso de haber rupturas a nivel de ADN habrá migración; y la longitud de la cola será directamente proporcional al daño generado *(Pareja, et al.).*

Los daños causados al material genético son debidos a que con las rupturas en la cadena de ADN, se da el relajamiento de la hélice; generando consecuencias a nivel celular como: errores en el sistema de reparación del ADN y alteraciones en la señalización celular. Estos daños generados en el ADN pueden ser atribuidos al aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno, capaces de causar daño en leucocitos de sangre periférica, ya que frecuentemente este tipo de daños son la base de enfermedades como cáncer y desordenes degenerativos *(Marrero, et al. 2007).*

A pesar de la gran utilización de la técnica y del tiempo que lleva siendo empleada aún no se conoce con exactitud el mecanismo por medio del cual se da la formación del "cometa", aunque hay evidencia de que el proceso de formación depende directamente de las condiciones a las cuales sea sometido el ADN, ya que bajo condiciones neutras, la cola del cometa se observa de una forma compacta, ya que en este caso se da un estiramiento de los lazos, sin embargo estos seguirían unidos a la matriz nuclear. Mientras que en el caso de la electroforesis en condiciones alcalinas se observa una mayor migración del ADN ya que se considera que en este caso los fragmento de ADN resultantes no están unidos a la matriz. Además de que después de someter el material a condiciones alcalinas se dará la formación de dos tipos de fragmentos de ADN; los que se forman por rupturas de una misma hebra y que están totalmente desnaturalizados, y son los que forman fragmentos totalmente independientes de resto del ADN y los fragmentos que se forman por rupturas alejadas, que están parcialmente desnaturalizados; lo cual impide un completo movimiento. Las moléculas parcialmente desnaturalizadas también pueden quedarse atrapadas en el núcleo lisado, impidiendo así su migración o bien disminuyéndola. En conclusión se podría decir que en la variante alcalina del ensayo cometa la cola se encuentra totalmente separada de la cabeza; lo cual da una mejor definición de la cola *(Fairbairn, et al. 1995).*

Aunque el ensayo cometa es una técnica que emplea la electroforesis como fundamento hay una pequeña variación con respecto a la electroforesis convencional ya que en la primera el desplazamiento de la molécula esta inversamente relacionado con el tamaño de los fragmentos, en el ensayo cometa alcalino la capacidad de resolución que se tiene es de unas pocas miles de rupturas/ célula, y por tanto la distancia que hay entre rupturas es de 10^9 Da de ADN. Es decir el rango de tamaño que se detecta va más allá de los rangos para los que fue diseñada la electroforesis convencional. En base a lo anterior se puede decir que la longitud del cometa dependerá de la longitud del lazo de ADN y no de la migración que tenga el material *(Olive, 2006).*

La sensibilidad del ensayo cometa supera en más de 100 veces las pruebas citogenéticas, que además de todo poseen un elevado costo y en la mayoría de los casos solo son aplicables a linfocitos de sangre periférica mientras que la electroforesis permite la evaluación de cualquier tipo de célula eucariota *(Prieto, 1999).*

Además dependiendo del objetivo del estudio se pueden implementar variantes que aumentan la sensibilidad del ensayo y permiten la detección de rupturas de cadena simple, doble, sitos lábiles al álcali, daño oxidativo o entrecruzamiento ADN-proteína, ADN-ADN *(Hernández, et al. 2007) (Prieto, 1999).*

En fechas más recientes han surgido otras variantes que brindan mayor especificidad, como la introducción de enzimas de reparación con actividad glicosilasa / endonucleasas, y debido a que se conoce cuál es la reparación que hacen estas enzimas, es que se puede conocer con mayor exactitud cuál es el daño causado por el agente genotóxico. También se pueden emplear otras enzimas como la formamidopirimidina- DNA glicosilasa (FPG), la cual detecta productos como la 8-hidroxiguanina y otras purinas alteradas; y para la detección de pirimidinas oxidadas se ha empleado la enzima endonucleasa III que actúa en purinas con anillo abierto, cuyo mayor producto de oxidación es 8-oxoguanina *(Collins, et al. 2008) (Zuñiga, 2009).*

Dependiendo de los objetivos de la investigación son las variaciones hechas, ya que se pueden hacer diversas implementaciones como por ejemplo variaciones en el pH dependiendo de las rupturas que se quieran poner de manifiesto, el tipo de célula empleada que pueden ser desde células obtenidas de cultivos celulares o células CHO obtenidas de ovario de hámster chino, células de algún tejido en especial (hígado, pulmón, estomago), o bien células de sangre periférica. Su uso ha sido empleado para diferentes investigaciones como lo son la biomonitorización humana en estudios ambientales, estudio epidemiológicos o bien para evaluar la genotóxicidad en diversos sistemas como lo son agua, aire, alimentos, y otros compuestos utilizados con fines terapéuticos *(Collins, et al. 1997).*

Algunas de las ventajas que posee la electroforesis de célula única (ensayo cometa), son que no se necesita un gran número de células ya una cantidad menor a 10, 000 células es suficiente para realizar el análisis *(Dhawan, et al.),* además tiene gran sensibilidad, que incrementa en la variante alcalina, ya que ahí se pueden detectar daños a partir de 50-10,000 rupturas / célula *(Olive, 2006).*

El primer paso a considerar es la obtención de la suspensión celular, la cual interferirá directamente en la visualización de las células, tanto del número de células por campo como de la distancia que haya entre célula y célula, lo cual es totalmente importante cuando se presenta un elevado nivel de daño.

Una vez que ha quedado la suspensión celular preparada, se procede a la preparación de los portaobjetos, los cuales deberán de tener como base una capa de agarosa de punto de fusión normal cuya función es asegurar una mejor adhesión de la segunda capa que consiste en agarosa de bajo punto de fusión que es donde se encuentran embebidas las células. Algunos autores hacen uso de una tercera capa de agarosa de punto de fusión normal, pero esta última es variable y queda a consideración del investigador ya que se ha visto que su ausencia no afecta, y que por el contrario permite una mejor neutralización del álcali. Durante esta etapa otro aspecto a considerar es la concentración de la agarosa ya que se sugiere que para la primera capa y para la tercera, en caso de que se decida emplearse la concentración debe ser de 1.0 - 1.5 %; y la concentración de la capa que contiene las células puede estar entre el 0.5 – 1. 0%; esto debido a que altas concentraciones de agarosa interfieren con la migración del ADN *(Hartmann, et al. 2003) (Wenjuan, et al 2009).*

Cuando las preparaciones han gelificado, el siguiente paso es colocarlas en una solución de lisis, la cual se caracterizara por su alto contenido en sales y detergentes. La finalidad de este paso es remover proteínas celulares y membranas facilitando así el posterior desenrollamiento del ADN. A partir de este paso se debe ser cuidadoso con la temperatura de todas las soluciones en las que se incubaran las preparaciones, ya que deben ser refrigeradas previamente antes de su uso, para asegurar la estabilidad del gel *(Arenciba, et al. 2011).*

El contenido de la solución de lisis puede variar de acuerdo al tipo de célula empleada ya que por ejemplo habrá algunas células en las que será necesario utilizar más de un detergente o se le adicionará dimetilsulfoxido (DMSO) en caso de que hayan eritrocitos presentes, con la finalidad de actuar como quelante de los radicales libres que pudieran ser liberados durante la lisis. La duración de este paso también es variable ya que puede ir desde 1 h hasta 24 h. El pH utilizado también dependerá del tipo de daño que quiera ponerse de manifiesto, pH neutro para la detección de rupturas de cadena doble y pH alcalino para poner de manifiesto ruptura de cadena doble, simple y sitios lábiles al álcali *(Olive, 2006).*

Una vez que se concluye el periodo de lisis, se recomienda lavar las preparaciones con agua para remover cualquier residuo de sal o detergentes que pudieran modificar el pH de la siguiente solución,

que es el buffer de electroforesis *(Hartmann, et al. 2003) (Klaude, et al. 1996).* Posterior a la lisis celular se continua con el paso de desenrollamiento de la cadena de ADN, el cual se da gracias a las rupturas de los puentes de hidrogeno, condición que se ve favorecida bajo condiciones alcalinas. En este paso además se producen las rupturas de cadena simple y se maximiza la expresión de los sitios lábiles al álcali. De acuerdo con el protocolo de Singh 1988 el buffer consiste en 1 mM de EDTA y 300 mM de NaOH con un pH > 13. El tiempo que las preparaciones permanecen en el buffer de electroforesis antes de que se inicie el corrimiento electroforético es de 20 min *(Hartmann, et al. 2003) (Wenjuan, et al 2009).*

Después de transcurridos los 20 min en el buffer de electroforesis las preparaciones serán sometidas a la electroforesis realizada bajo condiciones alcalinas (pH >13) y será en este paso donde se dé la formación de los cometas, ya que el ADN dañado abandonará el núcleo celular, migrando hacia el ánodo. Las condiciones normalmente utilizadas para el corrimiento son 25 V y 300 mA durante 20 min. Aunque siempre se debe de tomar en cuenta que el voltaje debe ser ajustado al volumen total de la caja de electroforesis (V/cm). Otra de la consideraciones hechas es la de mantener la temperatura constante, y se ha visto que temperaturas menores a 5°C mejoran la reproducibilidad del ensayo**.** Posterior a la electroforesis se prosigue a realizar la neutralización de las preparaciones, que generalmente es realizada enjuagando los portaobjetos con Trizma base a pH de 7.5 tres veces, y cada lavado tiene una duración de 5 min. Se aconseja que en el caso de que en la visualización microscópica se observen interferencias en el fondo de la preparación el tiempo de lavado puede aumentarse para mejorar esta situación *(Collins, et al. 2008) (Wenjuan, et al. 2009).*

El objetivo de la neutralización es renaturalizar el ADN de la cabeza del cometa, ya que las cadenas separadas durante el tratamiento alcalino serán unidas nuevamente por el superenrollamiento, y así las rupturas de cadena simple quedarán en la cola *(Wenjuan, et al. 2009).*

Para finalizar la técnica del ensayo cometa se debe realizar la tinción de las preparaciones; dentro de las técnica más empleada para su realización son las tinciones de fluorescencia siendo la más famosa la tinción con bromuro de etidio, el cual es un compuesto que se intercala en los espacios entre las pares de bases o entre la doble hélice. Otro agente utilizado para tinción de fluorescencia es DAPI (4,6-diamin-ino-2-fenilindol), el cual forma un complejo fluorescente con las rupturas de cadena doble *(Hartmann, et al. 2003) (Wenjuan, et al. 2009).*

Otra alternativa para realizar la tinción sin el uso de fluorescencia es el uso de la tinción con nitrato de plata, la cual ha mostrado ser eficiente, ya que hay técnicas con buena sensibilidad y que han logrado eliminar la inespecificidad, mejorando así el fondo de la tinción. El siguiente paso sería la evaluación del daño al ADN, el cual puede hacerse por medio de un análisis visual usando un microscopio de fluorescencia o bien a través de un software *(Bejamin, et al. 2014).*

4.2 VACUNA S3P-vac

Debido al papel fundamental que el cerdo tiene en el ciclo de vida del parasito es que se ha buscado disminuir la incidencia de cisticercosis porcina, evitando así la transmisión al humano, por medio de la elaboración de una vacuna dirigida a brindar protección al cerdo.

Los avances biotecnológicos han permitido el desarrollo de vacunas que son una gran promesa para el control de la enfermedad a través de la interrupción del ciclo de vida del parasito, en el cual los cerdos juegan un papel fundamental.

La elaboración de una vacuna contra cisticercosis, no ha sido la única en desarrollo ya que también se han probado vacunas contra parásitos como *Tripanozoma cruzi, Leishmania* y *Plasmodium*, aunque estas han mostrado poca efectividad; sin embargo en el caso de infecciones causadas por cestodos es muy diferente ya que se ha encontrado una buena efectividad.

En el caso particular de la cisticercosis, el éxito de la vacuna tal vez sea debido a que el parásito es vulnerable incluso cuando no hay ninguna intervención terapéutica; ya que en algunos casos es sensible a la respuesta inmunológica del huésped, debido a que se calcifican; pero esto depende del tejido en el cual se alojan ya que en sistema nervioso central (SNC) los cisticercos se mantiene vesiculares, debido a que aquí tal vez necesiten más tiempo para ser destruidos *(Sciutto, et al. 2007).*

Una de las versiones que se han desarrollado de las vacunas contra cisticercosis es la vacuna recombinante desarrollada por Harrison et al., 1999; la vacuna se componía de los antígenos sintéticos GK1, KETc1/p y KETc12/p, que fueron sintetizados de *Taenia crassiceps*, y están presentes en diferentes etapas del parasito tanto de *T. crassiceps* así como de *T. solium.*, descubriendo que la etapa más susceptible al taque inmunológico es la oncosfera; su éxito ha sido probado en ratones y cerdos y además el péptido GK1 ha mostrado efectividad al ser usado como adyuvante en el tratamiento contra cisticercosis *(Diaz, et al. 2013) (Flisser, 2001).* Diversas versiones de la vacuna contra cisticercosis han sido desarrolladas, y aunque en la fase experimental han tenido éxito eso no es suficiente, ya que no

solo basta probar su eficacia desde el punto de vista inmunológico y bajo condiciones controladas, sino que además debe ser de bajo costo; y probar su efectividad en las condiciones normales y rusticas bajos las cuales se mantiene a los cerdos de manera natural, además de tener una forma accesible de administración *(Hernandez, et al. 2007).*

La vacuna S3Pvac está compuesta por tres péptidos: KETc1, KETc12 y KETc7 conformados por 12, 8 y 18 aminoácidos, originalmente aislados de *T. crassiceps*, cuya estructura comparte antígenos con *T. solium*. Las primeras versiones de la vacuna fueron obtenidas de manera sintética, pero con el paso del tiempo se buscó reducir costos y se implementaron nuevas técnicas como su obtención por recombinación utilizando fagos filamentosos. Los tres péptidos de S3Pvac fueron identificados en cDNA de *T. crassiceps*, pero también se encontraron homólogos en *T. solium*, aunque recientemente se han encontrado homólogos también en *Taenia saginata*, *Echinoccocus granulosus* y *Echinoccocus multiloculares (Hernandez, et al. 2007) (Sciutto, et al. 2011).*

S3Pvac es obtenida a través de células de papaya debido a la accesibilidad y a que ya se conoce la secuenciación completa del genoma de la papaya. Para el diseño de la construcción y la transformación de la vacuna se hizo uso de la clonación usando un vector pUI235-5 con lo que se mejoró y se hizo más fuerte la expresión de transgenes.

Los péptidos KETc1 y KETc12 fueron modificados y se les adicionó seis residuos de histidina en el extremo terminal COOH para aumentar su tamaño y así facilitar su identificación y facilitar su detección y selección del tejido transgénico pWRG1515 que contiene el gen del receptor β-glucoronidasa, además del gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección usado para la co-transformación *(Hernandez, et al. 2007).*

Para la obtención de los callos de papaya se usó la papaya Maradol de Tabasco, los callos se obtuvieron de frutas verdes y de ahí se consiguieron los embriones citogenéticos para la inducción de callos embriogénicos (EmpCL), el bombardeo de partículas para conseguir la producción de los callos se hizo con partículas de PDS-1000/He (BioRAD). La identificación de las líneas celulares obtenidas por clonación se hizo con el uso de tecnologías como PCR y RT-PCR y se determinó que dos clones expresaron KETc7 y dos el polipéptido KETc12 y 15 expresaron KETc1.

La inmunización experimental se hizo con un extracto soluble de callos embriogénicos, además de que incluyó EmpCL pulverizado que posteriormente fue solubilizado en nitrógeno líquido; se hizo uso del

método de Lowry para determinación de proteínas *(Sciutto, et al. 2011).* Los antígenos aislados de *T. crassiceps* han demostrado brindar protección contra cisticercosis causada por *T. solium*, aunque aún está en duda la efectividad de estos antígenos usando extractos de antígenos enteros, ya que se ha visto que la respuesta es totalmente dependiente de la dosis empleada, por eso el interés de identificar cuáles son los antígenos específicos que brindan protección; haciendo uso de ADN recombinante, haciendo la identificación en extractos crudos de los clones respectivos como inmunogéno; encontrando que KETc7 posee capacidad protectora ya que tiene un epitopo de 17 aa (GK1), el cual también es expresado en las oncosferas de *Taenia solium*, observando que la etapa de desarrollo del parasito es la mejor para realizar un ataque ya que presenta mayor vulnerabilidad. Además de KETc7, se realizó la identificación de otros dos antígenos protectores KETc1 y KETc12, y al parecer estos últimos son los que brindan protección contra cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*. La respuesta protectora fue principalmente de tipo Th1 que es mediada por IFN-γ, siendo esta respuesta la característica frente a infecciones por parásitos *(Sciutto, et al. 2007) (Toledo, et al. 2001).*

Su capacidad protectora ha sido probada en cerdos que viven en zonas endémicas y se ha demostrado la reducción del 50 % en una prevalencia del 98 %, además de que también se ha visto una actividad terapéutica de S3Pvac *(Hernandez, et al. 2007).*

Sin embargo, se desconoce si la vacuna causa algún tipo de daño a nivel de ADN, ya que se tiene como parte aguas la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratón; estudio que permite la detección de lesiones de tipo citogenético, generadas por restos de cromosomas, o por cromosomas retardados que no se incluyen en el núcleo principal de la célula hija durante la etapa de anafase. En dicho trabajo se llegó a la conclusión que hubo un aumento significativo en la producción de micronúcleos a las 72 h post-tratamiento *(Mondragón, 2010).*

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que vacuna S3Pvac estimuló la formación de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de roedor, a las 72 h con las concentraciones de 500 y 1000 mg/kg de peso *(Mondragón, 2010),* se hizo necesaria la evaluación de la vacuna con otro ensayo como la electroforesis en geles de células individuales, que nos brindará la información necesaria para determinar si la vacuna S3Pvac produce rupturas en la molécula de ADN, causando genotoxicidad; por tanto nos planteamos responder la siguiente pregunta:

6 PREGUNTA CIENTIFICA

¿La vacuna S3Pvac genera daño a nivel de las cadenas del ADN?

7 JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática que la cisticercosis representa, se han buscado nuevas alternativas para combatir la enfermedad, apoyándose en los avances biotecnológicos que han permitido desarrollar diversas vacunas contra cisticercosis porcina, teniendo como una de las mejores alternativas S3Pvac; ya que al ser obtenida por medio de recombinación genética es insertada en cayos de papaya y posee la ventaja de reducir los costos, además de ser de fácil administración.

Diversas investigaciones se han enfocado a disminuir la cisticercosis ya que esta enfermedad afecta de igual forma a cerdos y humanos representando un importante problema de salud; a nivel mundial se tiene reporte que 50 millones de personas padecen NC, de las cuales 50 mil mueren cada *año (Flisser, 2001) (Fuentes, 2011).*

En lo referente a México hay un reporte de 500 casos por año; es decir 0.6 personas la padecen por cada 100 000 habitantes; siendo el grupo de edad más afectado de 15-44 años. Debido a que los pacientes afectados se encuentran en una edad productiva (estudiantes, trabajadores) el padecer la enfermedad podría afectar su rendimiento, desempeño laboral o escolar y representa un gasto importante ya que es una enfermedad de larga evolución y las intervenciones quirúrgicas realizadas para remediar la NC son de elevado costo, ya que el estadio avanzado de la enfermedad llega a ser incapacitante afectando así la economía en general, y no solo al individuo *(Resendiz, 2010) (Sartis, 1997).*

No solo la enfermedad en el humano representa pérdidas para el sector económico, la enfermedad en el cerdo también representa pérdidas ya que cuando se encuentran animales infectados en rastros o mataderos, la carne es decomisada quedando vetada del consumo humano. O incluso aunque la carne infectada sea vendida, su valor disminuye con respecto al valor de carne en buenas condiciones *(Resendiz, 2010).*

Tener una vacuna que no sea tóxica y disminuya o prevenga la infección sería muy importante para cortar la cadena de transmisión al humano, y debido a que de acuerdo con el estudio previo sobre la inducción de micronúcleos de sangre periférica realizado por Mondragón 2010 la vacuna S3P-vac es

capaz de aumentar la frecuencia de micronúcleos, es necesario saber si la vacuna es capaz de causar toxicidad en la estructura primaria del ADN *(Mondragón, 2010).*

8 HIPOTESIS

8.1 Alternativa

La vacuna S3Pvac causa genotoxicidad, visualizada por la aparición o por la generación de una cauda en forma de cometa.

8.2 Nula

La vacuna S3Pvac no causa genotóxicidad, ya que no se encuentran células en forma de cometa.

9 OBJETIVOS

8.1 Objetivo general: Determinar si la vacuna S3Pvac causa genotóxicidad mediante el ensayo cometa o de célula única.

9.2 Objetivos particulares

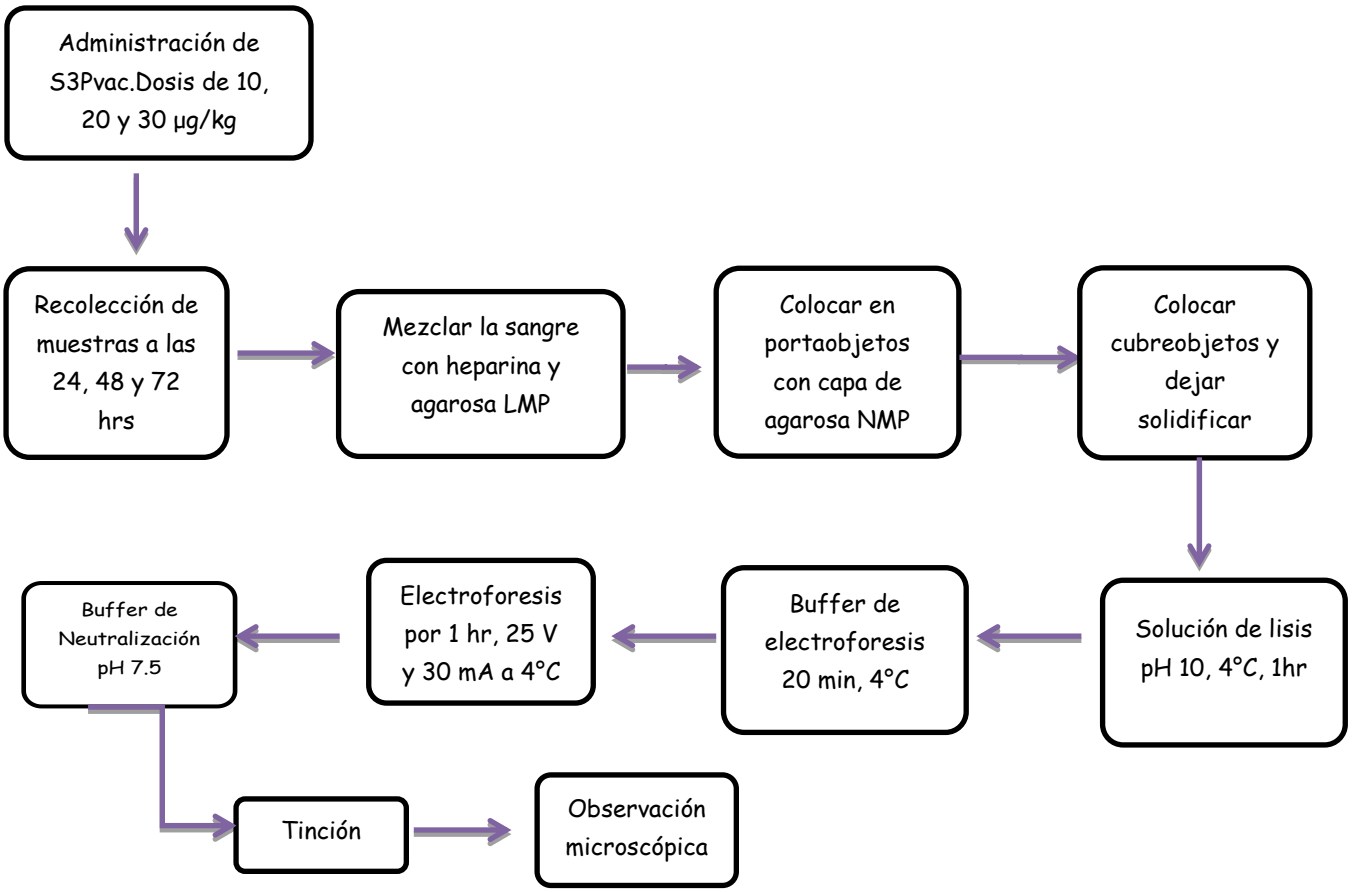
a) Establecer la concentración que causa toxicidad en ratones Balb/C.
b) Evaluar la variación de toxicidad en función del tiempo

10 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio analítico, experimental y transversal en roedores.

11 MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 Diagrama de trabajo



11.2 Animales de experimentación.

Se utilizaron 30 ratones macho Balb/c; de 5-6 semanas con un peso promedio de 16 g del Bioterio Claude Bernard de la BUAP, los cuales durante la etapa experimental se tuvieron en el vivario de la Facultad de Medicina de la BUAP bajo las siguientes condiciones: temperatura de 25 ± 2 °C, a una humedad relativa de 60 ± 10 %, y con ciclo de iluminación de 12 h *(Marrero, et al. 2007) (Collins, et al. 2008);* alimentados bajo una dieta comercial en forma de pellet y agua *ad libitum*. Todos los grupos de experimentación se manejaron bajo las mismas condiciones, y siempre siguiendo los lineamientos establecidos por la guía de ética para la investigación con animales de laboratorio *(Collins, et al. 2008).*

11.3 Bioética

Los animales empleados en la realización del proyecto fueron tratados bajo el cumplimiento de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

11.4 Tratamiento

Se formaron cinco grupos de estudio de 6 ratones, a cada uno se le marco de manera diferente para su identificación posterior, y se les administraron las siguientes sustancias en dosis única: Vacuna S3P-vac, ciclofosfamida y vehículo.

La vacuna S3P-vac fue proporcionada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México en forma de liofilizado. S3P-vac se conforma de tres péptidos obtenidos originalmente de *T. crassiceps*, y fue obtenida a través de células transgénicas de papaya.

Posteriormente se prepararon por grupo las dosis de prueba (10, 20,30 μg/kg de S3P-vac), utilizando agua inyectable como vehículo.

La ciclofosfamida fue preparada a dosis de 80 mg/kg, usando agua inyectable para su disolución.

Todas las sustancias fueron administradas por vía intraperitoneal y se ajustó que el volumen final fuera de 0.5 ml para todos los animales

Se administraron por vía IP las concentraciones 10, 20, 30 μg/kg de vacuna S3P-vac al grupo 2, 3 y 4 respectivamente, al grupo 1 se le administró ciclofosfamida a una concentración de 80 mg/kg, finalmente al grupo 5 se le administro agua inyectable a una concentración de 10 ml/kg.

12 Evaluación de la genotóxicidad de la vacuna S3P-vac a través de la electroforesis de geles en célula única

12.1 Preparación de portaobjetos cubiertos de agarosa punto de fusión normal (NMA) al 1%

Los portaobjetos con la capa de agarosa NMA 1% se prepararon un día antes de la realización de la toma de muestra; fueron sumergidos en metanol y se pasaron por fuego para remover restos de grasa.

Posteriormente se colocaron 300 µL de agarosa NMA 1% caliente e inmediatamente después se puso un cubreobjetos y se dejó solidificar al aire *(Toledo, et al. 2001).*

12.2 Recolección de la muestra

Se hizo un corte fino de la cola de cada ratón y se tomaron 10 µL de sangre a las 24, 48 y 72 h. Post tratamiento *(Arenciba, et al. 2011);* la sangre se depositó en un tubo ependorff con 5 µL de heparina sódica y se mantuvo a 37°C *(Marrero, et al. 2007),* posteriormente se le agregaron 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.5% a 37 °C, depositando 10 µL de la mezcla sobre el portaobjeto *(Collins, et al. 2008)* preparado previamente con la capa de agarosa NMA 1%, e inmediatamente se le coloco encima un cubreobjetos y se dejó solidificar a 4°C en obscuridad por 15 min, una vez transcurrido el tiempo y procurando no maltratar las capas del gel, el cubreobjetos fue retirado *(Tice, 1998).*

12.3 Lisis de membranas celulares

Las preparaciones fueron colocadas en la solución de lisis con pH final de 10, y se dejaron ahí por 1 h. a 4°C para asegurar la estabilidad del gel en la solución; a partir de este paso todos los procedimientos posteriores se realizaron con luz atenuada para evitar causar daños extras al ADN *(Tice, 1998).*

12.4 Buffer de electroforesis

Después de que las preparaciones se sacaron de la lisis, se enjuagaron con agua inyectable y se colocaron en el buffer de electroforesis con pH final > 13, donde permanecieron 20 minutos en reposo antes de que se realizara el corrimiento. Luego de este tiempo se llevó a cabo la electroforesis bajo las siguientes condiciones: 300 mA y 25 V, durante 30 min *(Collins, et al. 2008).*

12.5 Neutralización

Las preparaciones se lavaron 3 veces con el buffer de neutralización a pH de 7.5, procurando que cada lavado durara 5 min. Posteriormente las preparaciones se deshidrataron con metanol absoluto, para preservar las muestras por mayor tiempo y se conservaron en refrigeración hasta su lectura en el microscopio *(Wenjuan, et al. 2009).*

12.6 Tinción

Se realizó con bromuro de etidio, utilizando 10 µg/ml *(Lee, et al. 2004).*

12.7 Observación microscópica y análisis de imagen

La evaluación de las laminillas se realizó con un microscopio de fluorescencia y con enfoque de 40X. Se efectuó un conteo de cien células por laminilla, a las cuales se les fueron tomando fotografías que posteriormente fueron analizadas con el software de libre acceso: Open Comet (v1.3), obtenido de: *www.cometbio.org*

12.8 Análisis Estadístico

Se analizó con la prueba no paramétrica de ajuste de bondad: chi cuadrada *(Cárdenas, 2007).*

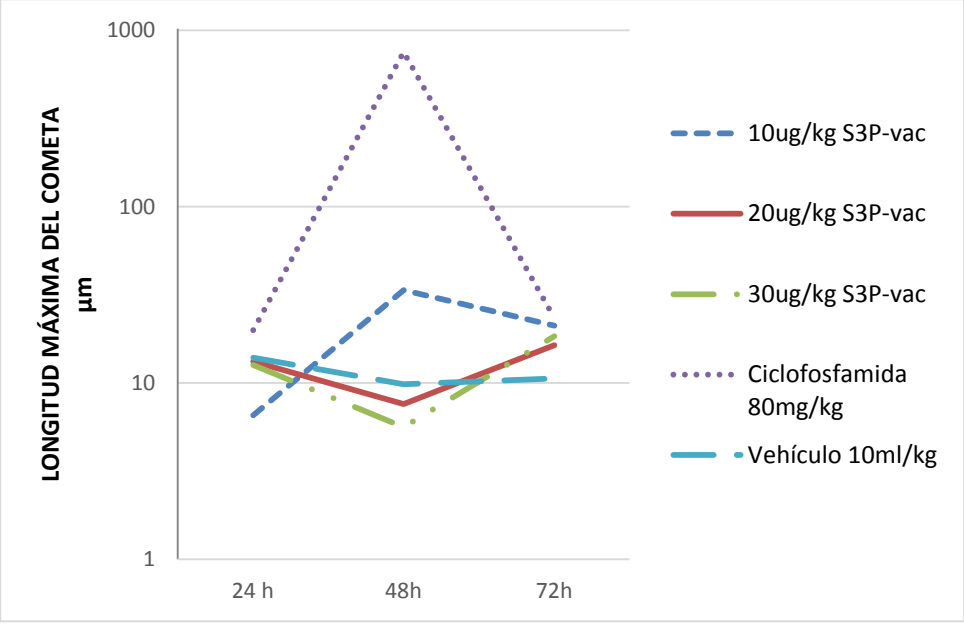
13 RESULTADOS

La genotoxicidad de S3P-vac fue evaluada utilizando la técnica de Electroforesis de Célula única bajo condiciones alcalinas (pH >13). Previamente se mencionó que se realizó la lectura de cien células por laminilla, obteniéndose un total de 600 células por grupo.

En la siguiente gráfica se muestra la magnitud de la cauda en función de la concentración de la vacuna administrada y de los testigos: positivo y negativo.

Tabla 1: Promedio de la Longitud de la Cola (µm**),** post tratamiento con vacuna S3P-vac.

Compuesto	**24 h**	**48 h**	**72 h**
S3Pvac-10µg/kg	6.58	33.7	21.13
S3Pvac-20µg/kg	13.28	7.59	16.38
S3Pvac-30µg/kg	12.65	5.63	18.44
C(+)	19.92	753.85	23.43
C(-)	13.94	9.84	10.63



Gráfica 1: Promedio de la longitud de la cola (µm)

Fuente: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina de la BUAP

El grupo uno muestra el comportamiento de la vacuna S3P-vac a una concentración de 10 µg/ kg, inicio con la menor longitud de la cauda en todos los grupos con un valor promedio de 6.58 µm estando incluso por debajo del control negativo, el cual a las 24 h presentó una longitud promedio de 13.94 µm; la mayor longitud se encontró en el grupo que fue tratado con ciclofosfamida a una concentración de 80 mg/kg.

Los valores de las concentraciones de 20 y 30 µg/ kg presentaron un comportamiento similar; ya que a las 24 h presentaron una cauda de 13.28 y 12.65 µm respectivamente estando por arriba del control negativo pero sin sobrepasar el valor de la ciclofosfamida.

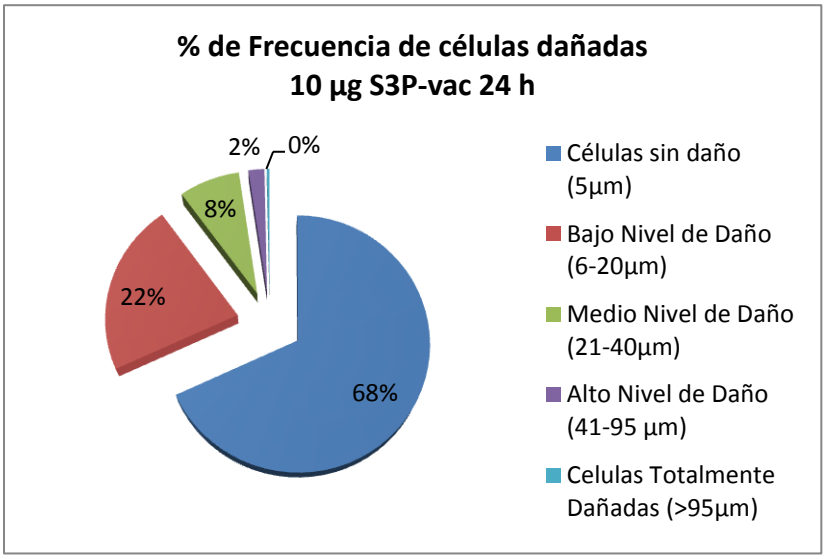
A las 48 h se encontró la máxima longitud para la ciclofosfamida, ya que se obtuvo un valor de 753.85 µm, el segundo grupo con el valor más elevado fue la concentración de 10 µg/kg de vacuna S3P-vac, los grupos de 20 y 30 µg/kg de S3P-vac tienden a disminuir la longitud de la cauda con respecto a los valores encontrados a las 24 h; y también con respecto al testigo negativo donde se obtuvo un valor de 9.84 µm; encontrando la menor longitud producida a las 48h con la concentración de 30 µg/kg de vacuna S3P-vac.

En general a las 72 h en todos los grupos tratados con la vacuna S3P-vac el valor de la longitud volvió a aumentar, excepto en la concentración 10 µg/kg donde el valor nuevamente disminuyo aunque sin llegar al valor de las 24 h que fue mucho más bajo. En el caso del control positivo el comportamiento fue similar al de la dosis de 10 µg/kg y de igual manera el valor de longitud promedio disminuyo nuevamente (Ver gráfica 1). El grupo que menor longitud presentó fue el control negativo, con un valor de 10.73 µm.

En los siguientes gráficos se muestra el porcentaje de la frecuencia de las diferentes categorías de daño producido por las diferentes concentraciones probadas de acuerdo a la escala de Speit (1995) y Collins (2004) en donde la migración del ADN es proporcional al daño causado. Además también se presentan las tablas donde se muestra la variación en el porcentaje de frecuencias de daño con respecto al tiempo.

Escala de Speit (1995) y Collins (2004):

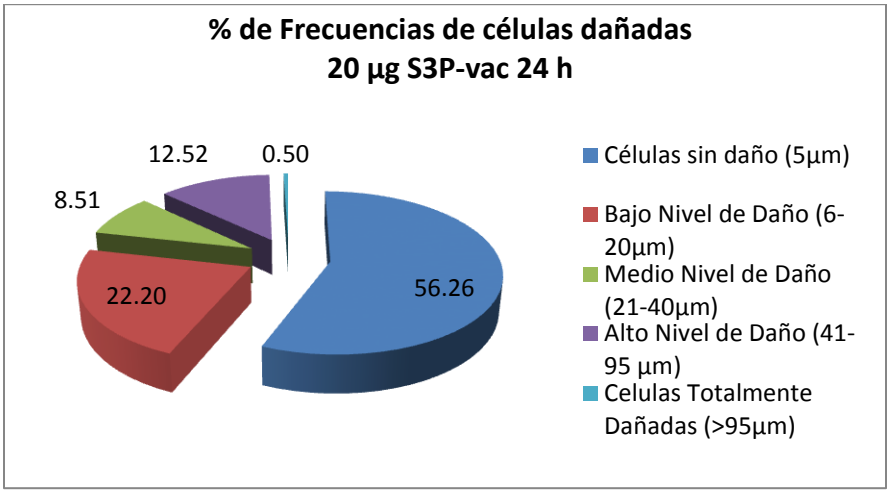
- Categoría 0: células sin daño (5µm)
- Categoría I: células con bajo nivel de daño (5-20 µm)
- Categoría II: células con medio nivel de daño entre (20-40 µm)
- Categoría III: células con alto nivel de daño entre (40-95 µm)
- Categoría IV: células totalmente dañadas superior (> 95 µm)



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 2: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 10 µg// kg a las 24 h

A las 24 h en la concentración de 10 µg/kg de S3P-vac se tuvo un 68.11 % de células sin daño (0-5 µm), en este grupo fue donde se encontró el mayor porcentaje de células sin daño, hubo una frecuencia de 21.86 % de cometas con bajo nivel de daño (6-20 µm), 7.67% de células con nivel medio de daño (21-40 µm). El 2% de las células presentó alto nivel de daño (41-95 µm) y solo el 0.33% de ellas estaban totalmente dañadas.

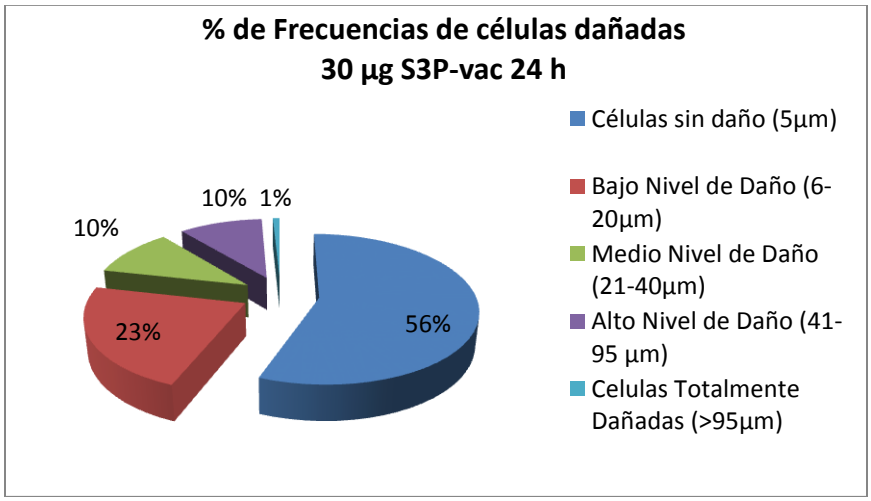


FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 3: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 20 µg/ kg a las 24 h

El segundo grupo que fue la concentración de 20 µg/ de S3P-vac a las 24 h también presentó la mayor frecuencia en la categoría de células sin daño con un valor de 56.26%, el porcentaje de células con bajo nivel de daño fue de 22.2 %.

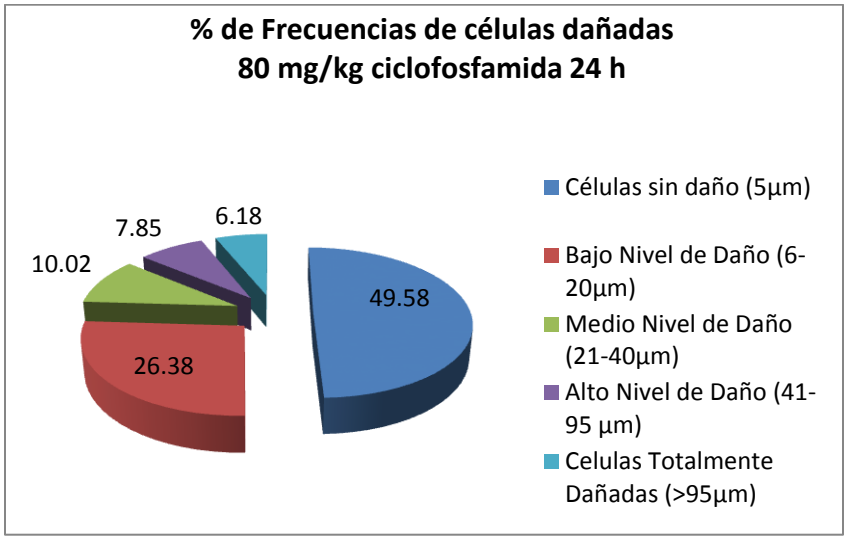
En la categoría de células con un nivel de daño medio se tuvo un valor de 8.51 %, mientras que las células con alto nivel de daño presentaron una frecuencia de 12.5 % y el 0.5% del total estuvo dentro de la categoría de células totalmente dañadas.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 4: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 30 µg/kg a las 24 h

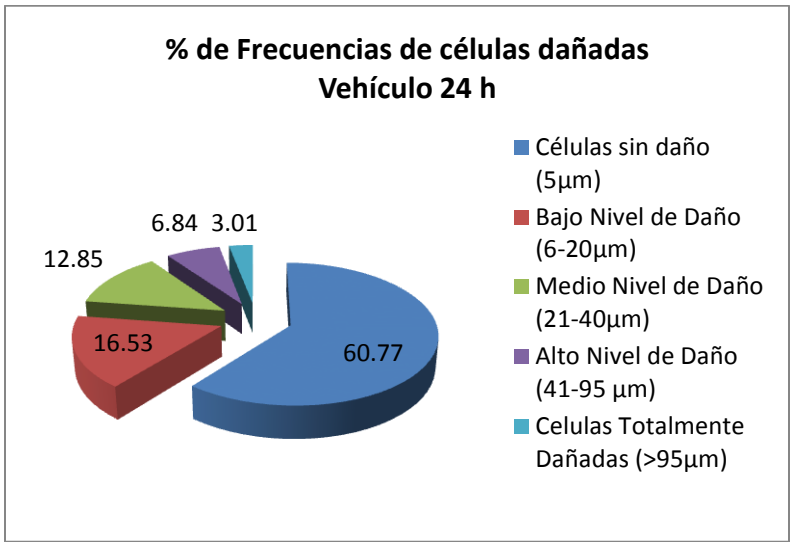
Con la concentración de 30 µg/kg de S3P-vac se presentaron valores muy similares al grupo anterior, ya que el mayor porcentaje estuvo dentro de la categoría de células sin daño con un valor de 55.92 %, las células con bajo nivel de daño tuvieron una frecuencia de 22.53 %. En la categoría de células con un nivel de daño medio se presentó una frecuencia de 10.51 %, teniendo un valor similar en la categoría de alto nivel de daño con un porcentaje de 10.18 % y finalmente hubo 0.83 % de células totalmente dañadas.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 5: Porcentaje de frecuencia de células dañadas Ciclofosfamida 80 mg/kg a las 24 h

El cuarto grupo que fue el tratado con 80 mg/kg de ciclofosfamida, utilizado como control positivo tuvo una frecuencia de 49.8 % de células sin daño, 26.37 % con bajo nivel de daño, 10.01 % con nivel medio de daño, 7.86 % con alto nivel de daño y 6.17 % de células totalmente dañadas.



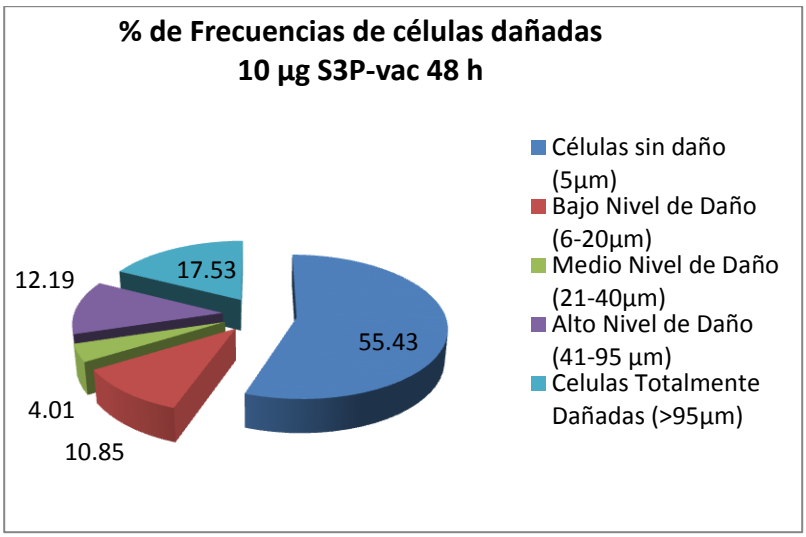
FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 6: Porcentaje de frecuencia de células dañadas vehículo (sln. salina) a las 24 h

En el control negativo se tuvo una frecuencia de 60.76 % de células sin daño, 16.52 % de células con bajo nivel de daño, 12.85 % con nivel de daño medio, 6.84 % de células con alto nivel de daño y 3 % de células totalmente dañadas.

En general a las 24 h las frecuencias en los diferentes grupos mostraron valores más elevados en la categoría de células sin daño, menos en el grupo de ciclofosfamida; con respecto a las frecuencias que presentaron los grupos con las diferentes concentraciones de S3P-vac, todos tuvieron los valores más altos en la categoría de células sin daño y células con bajo nivel de daño, presentando frecuencias bajas de células con alto nivel de daño y células totalmente dañadas.

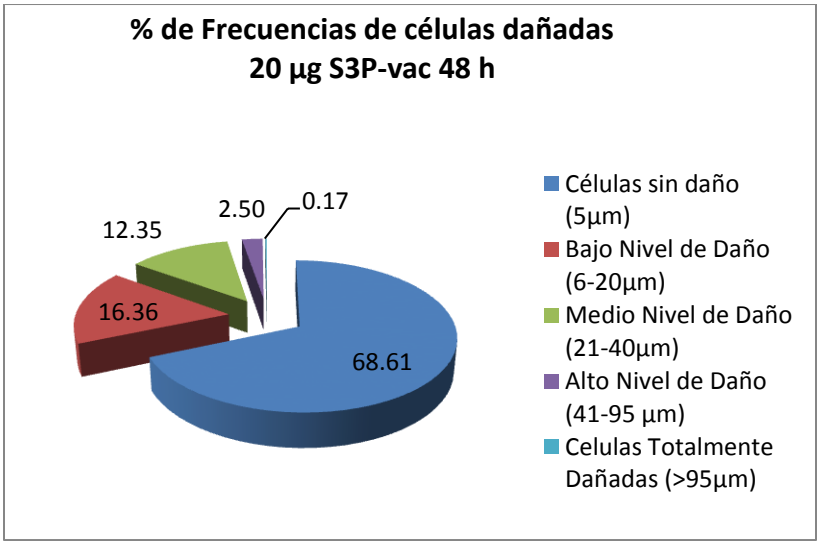
De acuerdo a los resultados anteriores a las 24 h y para p= 0.05, se encontró relación entre las variables, esto se determinó mediante la prueba de X^2. A través de esta prueba se puede decir que las diferencias observadas son reales; se obtuvo un valor experimental de $X^2 = 157.45$, siendo el valor crítico de X^2 de 26.296. Encontrándose diferencias entre las tres concentraciones de la vacua S3P-vac, con respecto al testigo negativo.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 7: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 10 µg/ kg a las 48 h

En la gráfica no. 7 se presentan los resultados del porcentaje de cometas encontrados a las 48 h post tratamiento. Con la concentración de 10 µg/kg de S3P-vac la mayoría de las células no presentaron daño o el daño fue mínimo, ya que mostraron frecuencias de 55.43 % y 10.85 % respectivamente; hubo un 4.01 % de células con daño medio; mientras que las frecuencias de las categorías de daño alto y daño total aumentaron con respecto a los valores obtenidos a las 24 h, obteniéndose valores de 12.19 % con un elevado daño y 17.53 % con daño total.

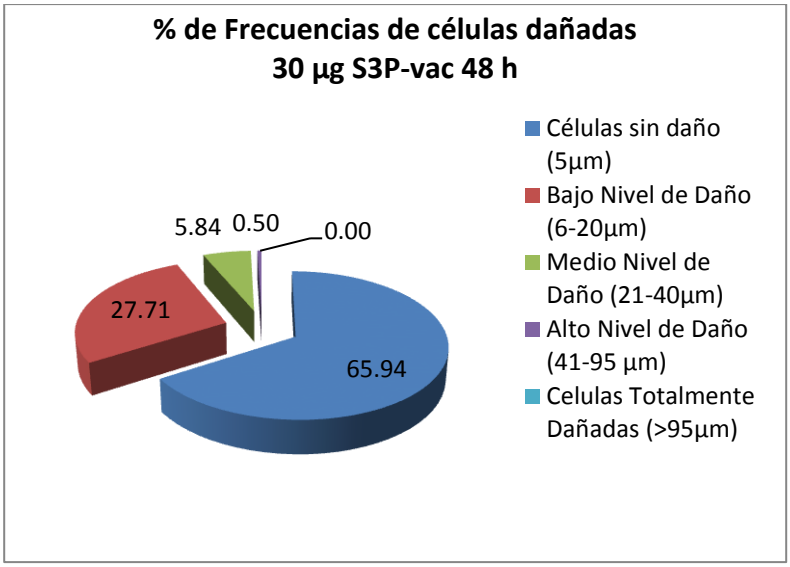


FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 8: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 20 µg/ kg a las 48 h

En la concentración de 20 µg/kg de S3P-vac el porcentaje de frecuencias aumentó a 68. 61 % con respecto a lo observado a las 24 h donde el valor fue de 56.26 %; sin embargo, hubo una

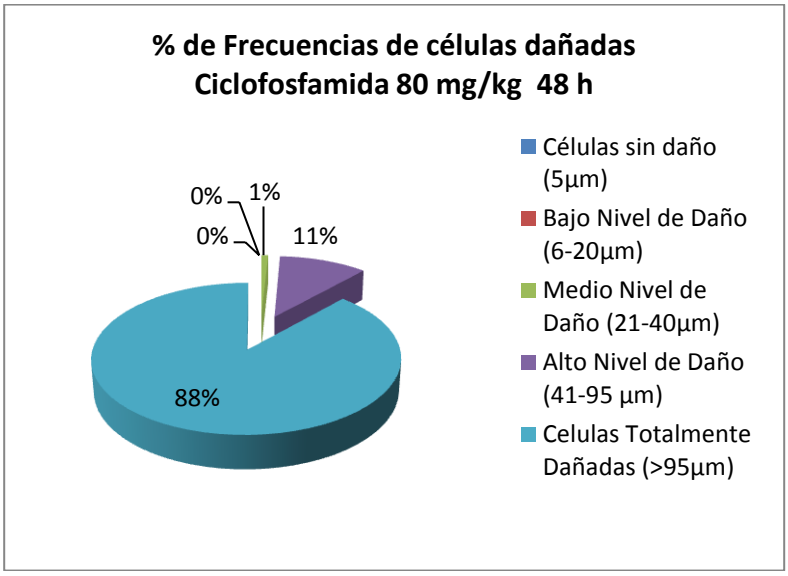
disminución en las demás categorías con respecto a los valores obtenidos a las 24 h; el valor de células con bajo nivel de daño fue de 16.36 %, el nivel de daño medio fue de 12.35 %, células con alto nivel de daño fue de 2.50 % y las células totalmente dañadas fueron 0.17 %.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 9: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 30 µg/ kg a las 48 h

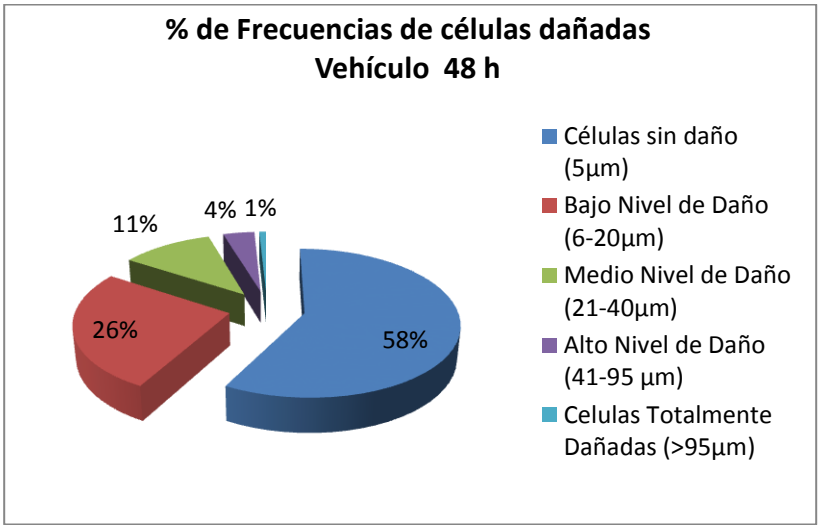
El tercer grupo (30 µg/kg de S3P-vac), mostró un comportamiento similar al grupo anterior con respecto a las frecuencias obtenidas a las 24 h, para las 48 h la frecuencia de células sin daño y con bajo nivel de daño aumento a 65.94 % y 27.71 %, pero la frecuencia de todas las demás categorías disminuyó a 5.84 % con nivel medio, 0.50 % nivel alto y no hubo células con daño total.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 10: Porcentaje de frecuencia de células dañadas Ciclofosfamida 80 mg/ kg a las 48 h

Tal como se esperaba en el control positivo a las 48 h, fue donde se encontró el máximo daño ya que no se encontraron células sin daño o con bajo nivel, el porcentaje de células con daño medio es mínimo 0.83 %, hubo 10.85 % de células con alto nivel de daño y la mayor parte de la población celular estuvo en la categoría de células totalmente dañadas con una frecuencia de 88.31 %; siendo este valor la mayor frecuencia de daño observada en todos los grupos.

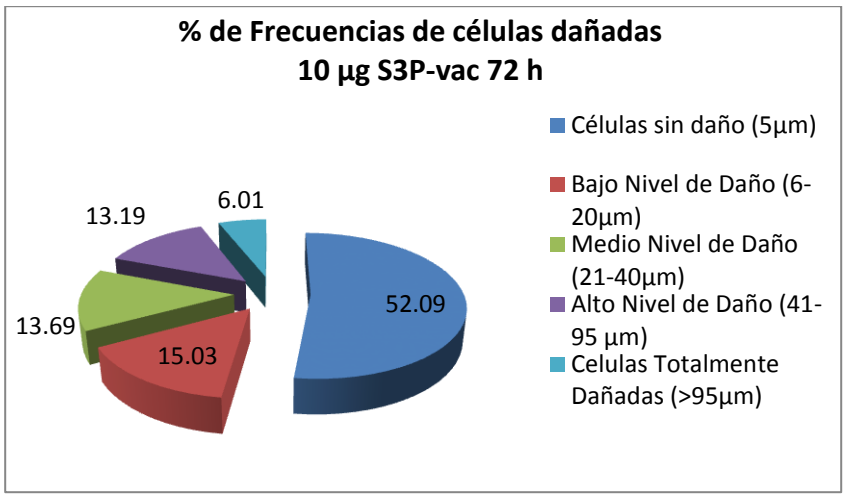


FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 11: Porcentaje de frecuencia de células dañadas Vehículo (sln. Salina) a las 48 h

En el control negativo la mayor parte de las células estuvo en la categoría de células sin daño y bajo nivel de daño con frecuencias de 57.93 % y 26.21 %, el valor de células con nivel medio fue de 11.19 %, mientras que los valores con alto nivel de daño y daño total aumentaron con respecto a los observados a las 24 h; células con alto nivel de daño 3.84 % y células con daño total 0.83 %.

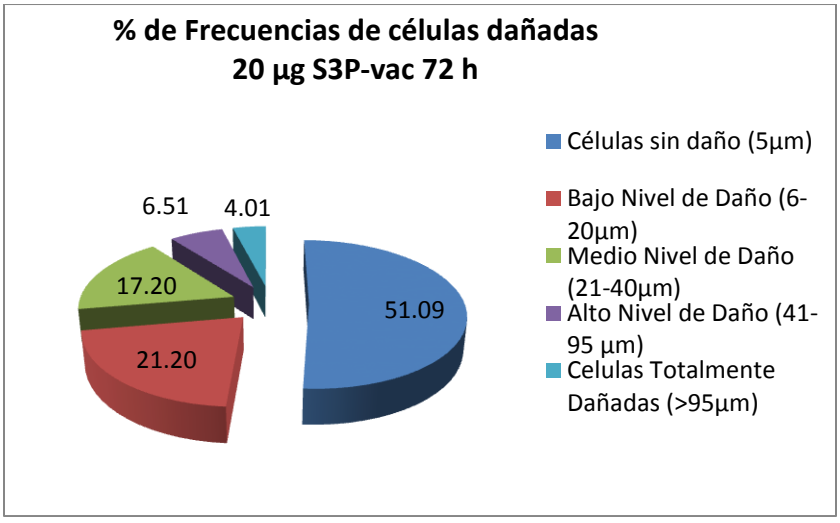
Al emplear la prueba de X^2 para los resultados obtenidos a las 48 h y con una $p= 0.05$, se encontró relación entre las variables, es decir el aumento en la frecuencia de células dañadas está directamente relacionado con la administración de las diferentes sustancias, X^2 experimental= 2437.70 y con valor crítico de X^2= 26.296.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 12: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 10 µg/kg 72 h

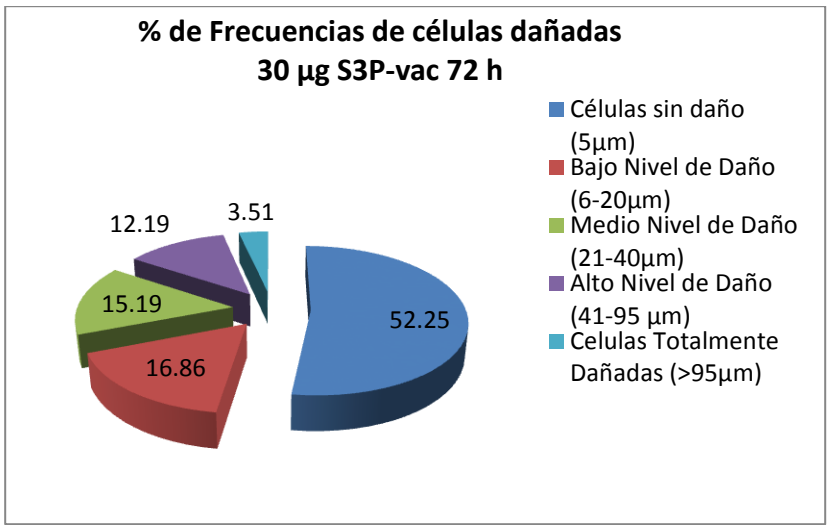
En general a las 72 h la mayoría de las células se encontraron dentro de las categorías de células sin daño. En 10 µg/kg de S3P-vac el porcentaje fue de 52.09 % siendo la menor frecuencia de los tres tiempos, en la categoría de células con bajo nivel de daño se tuvo una frecuencia de 15.03 %. Las células con nivel de daño medio presentaron una frecuencia de 13.69 %, células con daño alto tuvieron un valor de 13.19 %, mientras que la frecuencia de células con daño total disminuyó a 6.01 % con respecto de las 48 h.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 13: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 20 µg/kg 72h

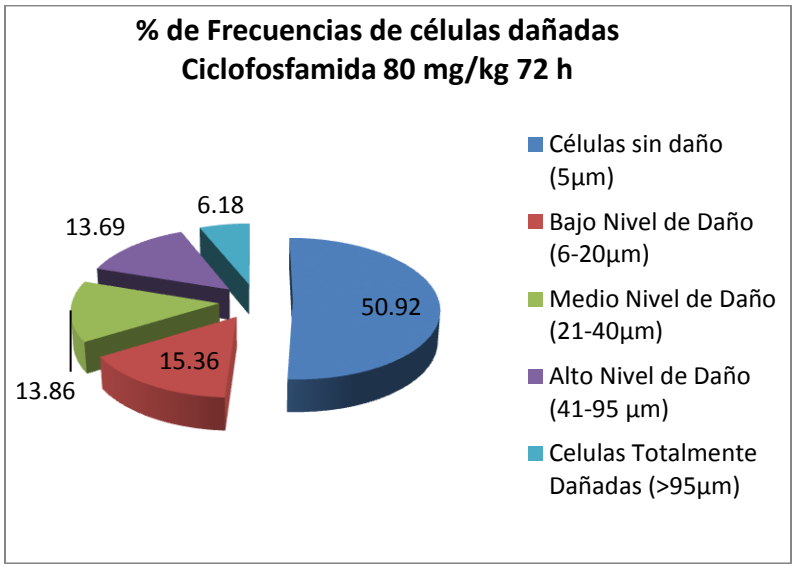
Con 20 µg/kg de S3P-vac los valores obtenidos fueron los siguientes: células sin daño 51.09 %, bajo nivel de daño 21.20 %, nivel de daño medio 17.20 %, alto nivel de daño 6.51 % y células totalmente dañadas 4.01 %.



FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 14: Porcentaje de frecuencia de células dañadas 30 µg/kg 72h

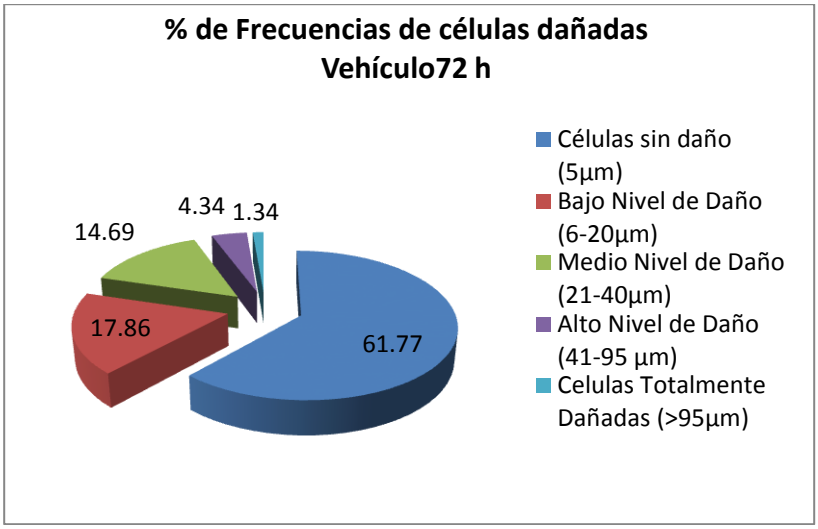
En el grupo de 30 µg/kg de S3P-vac el 52.25 % de células no presentaron ningún daño, 16.86 % presentaron bajo nivel de daño, 15.19 % tuvieron nivel medio de daño, 12.19 % con daño elevado y 3.51 % de las células tuvieron daño total.



Gráfica 15: Porcentaje de frecuencia de células dañadas Ciclofosfamida 80 mg/kg 72 h

FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

En grupo tratado con ciclofosfamida a las 72 h la mayoría de las células no presentaron daño 50.92 %; el 15.36 % tuvo bajo nivel de daño, 13.86 % presentaron daño medio, 13.69 % con daño alto y el 6.18 % de la población celular estuvo totalmente dañada.



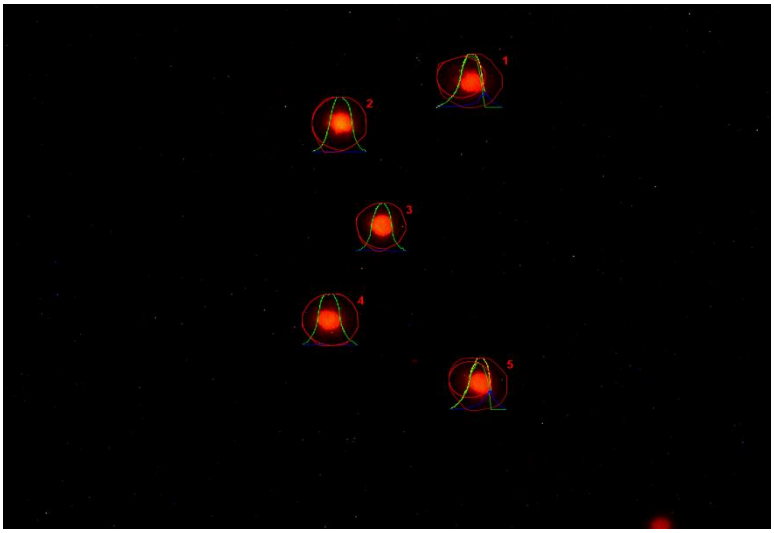
FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Gráfica 15: Porcentaje de frecuencia de células dañadas Vehículo (sln. salina) 72 h

El vehículo presentó la mayor frecuencia de células sin daño a las 72 h dentro de todos los grupo con 61.77 %; el 17.86 % tuvo un bajo nivel de daño, 14.69 % tuvieron daño medio, y las frecuencias obtenidas de las categorías de alto nivel de daño y daño total disminuyeron a comparación de todos los demás grupos presentando valores de 4.34 % y 1.34 % respectivamente.

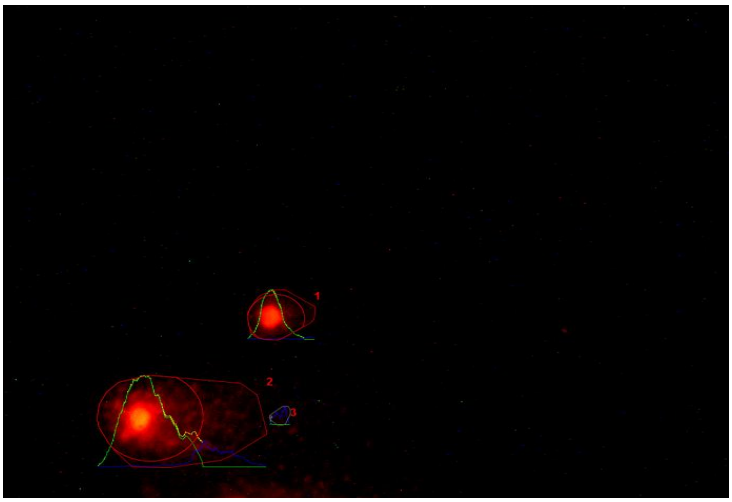
Para los resultados de 72 h y con de p= 0.05, se encontró relación entre las variables, esto se determinó mediante la prueba de X^2; con lo que se puede decir que las diferencias observadas son reales; se obtuvo un valor experimental de $X^2 = 87.48$, siendo el valor crítico de X2 de 26.296. Encontrándose diferencias entre las tres concentraciones de la vacua S3P-vac, con respecto al testigo negativo.

14 Imágenes de cometas de acuerdo a la clasificación de los distintos tipos de daño de acuerdo a la escala de Speitt y Collins



FUENTE: fotografía obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

FIGURA 1: Se muestran linfocitos de sangre periférica de ratón, sin daño (tratados con solución salina 24 h post tratamiento) analizadas con el software Open Comet



FUENTE: fotografía obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Figura 2: Se observan linfocitos tratados con 10 ug/kg S3P-vac 48 h. Cometas con alto nivel de daño, identificado y clasificado con el software open comet. (Larralde, 2006) Cometa con bajo nivel de daño. (2) Cometa con alto nivel de daño, se observa la migración del ADN fuera del núcleo.

FUENTE: fotografía obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Figura 3: Se observa un linfocito con desplazamiento importante del ADN o cometa, daño total, ocasionado por tratamiento con ciclofosfamida 80 mg/kg 48 h

15 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizó la electroforesis alcalina de célula única para determinar si la vacuna S3P-vac produce genotoxicidad o no, para ello la prueba se realizó en un modelo murino utilizando ratones Balb/c ya que de acuerdo con un estudio de inducción de la genotóxicidad en linfocitos en tres líneas de ratón diferentes a través del ensayo cometa realizado por Arenciba *et al*. 2011, se concluyó que Balb/c fue el mejor biomodelo para la evaluación de la Genotoxicidad debido a la baja frecuencia basal de daño al ADN; concluyendo que esta línea es la más adecuada para la evaluación preclínica de fármacos, drogas y vacunas *(Arenciba, et al. 2011).*

Se probaron tres concentraciones diferentes de la vacuna S3P-vac, un control positivo usando 80 mg/kg de ciclofosfamida como control de calidad ya que debido a su acción como agente alquilante bifuncional que forma monoaductos y enlaces cruzados entre cadenas, provoca rupturas; también se utilizó SSI como vehículo y como control negativo *(Diaz, 2008).*

Las concentraciones administradas de la vacuna S3P-vac fueron de 10, 20 y 30 μg/kg; siendo 10 μg la concentración empleada como potenciador de la respuesta inmune humoral de acuerdo a la patente de registro EP2738256 A2 *(Repetto, 2009).* De acuerdo con Sciutto E. *et al* (2011) a menor concentración de S3P-vac la inmunización es mejor, teniendo valores de 75% de efectividad; y a mayor concentración el porcentaje de inmunización va disminuyendo llegando al punto en que la infección se ve favorecida en dosis de 5-10 mg /ratón *(Sciutto, et al. 2011).*

El comportamiento de una determinada sustancia dentro de un organismo depende de factores como la concentración administrada, absorción, distribución, biotransformación de la molécula y del tiempo de exposición *(Repetto, 2009).*

De acuerdo al estudio realizado se encontró que en las tres concentraciones administradas de la vacuna S3P-vac y en los tres tiempos, hubo diferencias significativas con respecto al testigo negativo, con valor de $p< 0.05$; sin embargo la mayor frecuencia de daño se encuentró en la concentración de 10 μg/kg a las 48 h con 17.53 porciento de cometas con daño total. La dosis de 10 μg/kg de S3P-vac, presentó un comportamiento similar al de la ciclofosmamida, que tiene un mecanismo de daño indirecto ya que después de su administración se sabe qué forma enlaces covalentes con biomoléculas celulares, mientras que las especies reactivas de oxigeno causan peróxidos al reaccionar con los fosfolípidos de membrana, mecanismos regulados por los niveles de glutatión y otros proteinoles que

tienen capacidad de neutralizar radicales libres ya que son agentes nucelófilos, además de reducir agentes oxidantes *(Repetto, 2009).*

Un compuesto puede generar toxicidad de dos formas: alterando la estructura celular o la función, cabe mencionar que cualquiera de las fallas presentadas puede desencadenar bien un daño estructural o funcional. Una vez que las moléculas toxicas se han unido a biomoléculas pueden causar el daño de forma potencialmente reversible causando un daño subletal, provocando en la mayoría de los casos un daño estructural. El daño causado también puede ser irreversible cuando las alteraciones son estructurales, siendo letales para la célula *(Repetto, 2009).*

Una vez que la vacuna S3P-vac se ha absorbido, llega a circulación sistémica y desencadena una respuesta inmune, que genera un aumento en la proliferación celular y una elevada producción de citosinas inflamatorias (IL-2 y IFN-γ) *(Diaz, et al. 2013).*

Con los resultados obtenidos se puede decir que a las 24 h las frecuencias de células dañadas se encuentran a las dosis de 20 y 30 μg/kg ya que las frecuencias más elevadas están en la categoría de células con alto nivel de daño, teniendo una frecuencia incluso mayor a la del control positivo, se podría decir que a las 24 h ninguna de las sustancias causa un gran daño ya que el mayor porcentaje de frecuencias se encuentra dentro de las categorías de células sin daño y células con daño, y considerando que para el ensayo cometa se acepta hasta un 20 % de células dañadas en condiciones normales, este límite solo sería rebasado ligeramente en los grupos de 10, 20, 30 μg/kg de S3P-vac y el control positivo 80 mg/kg CF ya que el control positivo muestra todos sus porcentajes por debajo de ese nivel. El comportamiento de vehículo no muestra gran variación con respecto al tiempo ya que en los tres tiempos evaluados todos los porcentajes están por debajo del 20 % establecido como límite *(Arenciba, 2014).*

La dosis en la cual se observa el mayor daño es de 10 μg/kg S3P-vac ya que es en esta dosis donde se observa la mayor frecuencia de cometas en la categoría de células totalmente dañadas de 17.53 % y siendo a las 48 h donde se observa el pico máximo de daño, observándose como lo muestra la gráfica de cinética que la dosis de 10 μg/kg S3P-vac tiene un comportamiento similar al de la CF, es decir actúa de forma indirecta ya que en el caso de la ciclofosfamida el máximo daño también es observado a las 48 h debido a que es un compuesto que genera el daño de forma indirecta siendo uno de los metabolitos generados durante su biotransformación el causante del daño. Para el caso de la ciclofosfamida la frecuencia de células totalmente dañadas es de 88.31 % a las 48 h siendo este el máximo daño causado en todos los grupos.

Debido a la composición de S3P-vac el daño observado no propiamente podría ser causado por los péptidos que son de naturaleza proteica, sino que al ser obtenida en células transgénicas de papaya, en esta última se han encontrado compuestos como el bencil isocianato asociado a abortos espontáneos y cáncer de próstata, además de la carpasemina que es otro compuesto encontrado en la papaya y que posee propiedades antihelmínticas pero también se ha encontrado que el extracto acuoso de carpasemina ha demostrado toxicidad en ratas *(Rangel, 2009).*

Debido a que S3P-vac es una vacuna que aún se encuentra en fase de investigación y al no estar disponible en el mercado, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción, sin embargo sí se sabe que su acción inmunogénica la ejerce a través de la producción de citosinas pro inflamatorias a través de una respuesta celular específica, ya que está comprobado que induce una respuesta sistémica de protección contra el cisticerco; reduciendo la instalación del cisticerco en una 90 % y brindando protección inmunológica a más del 70 % de la población en la que fue probada *(Flisser, 2001).*

A pesar de la observación de un aumento en la frecuencia de células dañadas, no se puede asegurar que el daño causado sea irreversible, debido a los mecanismos de reparación de daño al ADN, sin embargo bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo cometa, eso no puede determinarse ya que para conocer si el daño es irreversible es necesario la realización del estudio con algunas implementaciones que lo harían más específico *(Klaude, et al. 1996).*

El siguiente cuadro muestra el tipo de daño causado por las diferentes sustancias en distintos tiempos, a pesar que las dosis de S3Pvac muestran un aumento en el porcentaje de daño en los diferentes niveles de daño sin embargo se sabe que la célula es capaz de reparar daños menores en el ADN ya que bajo condiciones normales las células están expuestas a procesos endógenos que producen daño, y el daño solo es trascendental cuando este daño supera los mecanismos de reparación celular *(Lieber, 2010)* de acuerdo con Arrebola 2014 en un trabajo de la Evaluación de la Eficiencia de Biomodelos Murinos en los Ensayos de Genotoxicidad y Antigenotoxicidad en condiciones normales se acepta un 20 % de daño elevado o total, sin que haya un punto en el que los mecanismo de reparación sean superados. En el caso de la vacuna S3P-vac en ninguna de las concentraciones probadas se supera el 20 % de daño permitido ya que la mayoría de células esta como células sin daño o con bajo nivel de daño; a comparación del grupo tratado con ciclofosfamida donde se observa el mayor porcentaje de daño a las 48 h con 88.31 % de células con daño total *(Arenciba, 2014).*

S3Pvac	Porcentaje % del daño				
10µg/Kg	Sin daño	Daño Bajo	Daño Medio	Daño Alto	Daño Total
24h	68.11	21.87	7.68	2	0.33
48h	55.43	10.85	4.01	12.19	17.53
72h	52.09	15.03	13.69	13.19	6.01
20 µg/kg					
24h	56.26	22.2	8.51	12.52	0.5
48h	68.61	16.36	12.35	2.5	0.17
72h	51.09	21.2	17.2	6.51	4.01
30 µg/kg					
24h	55.93	22.54	10.52	10.18	0.83
48h	65.94	27.71	5.84	0.5	0
72h	52.25	16.86	15.19	12.19	3.51
Ciclofosfamida					
24h	49.58	26.38	10.02	7.85	6.18
48h	0	0	0.83	10.85	**88.31**
72h	50.92	15.36	13.86	13.69	6.18
SSI					
24h	60.77	16.53	12.85	6.84	3.01
48h	57.93	26.21	11.19	3.84	0.83
72h	61.77	17.86	14.69	4.34	1.34

16 CONCLUSIONES:

1. Se determinó que la vacuna S3P-vac es genotóxica, ya que causa un aumento en la frecuencia de células en forma de cometa.
2. El mayor daño se encontró en la concentración de 10 μg/kg a las 48 h con un porcentaje de 17.53 % de células con daño total; sin embargo, la frecuencia se encuentra por debajo del 20 % que es reportado por Arenciba F. (2007) como un porcentaje de daño aceptado bajo condiciones normales en ratones Balb/c.
3. Con respecto al tiempo la dosis de 10 μg/kg de S3P-vac, muestra la frecuencia máxima de daño a las 48 h, teniendo un comportamiento similar a la ciclofosfamida, actuando con un mecanismo de daño indirecto. Con las concentraciones de 20 y 30 μg/kg se observa un comportamiento contrario ya que a mayor tiempo, el daño va disminuyendo, de forma similar al control negativo.

17 Bibliografía

1. Aluja A de S, Villalobos A. N.; ***Cisticercosis por Taenia solium en cerdos de México***; Veterinaria México. 2000; 31(Aluja, 2000): 239-24
2. Arenciba A.D.F.; ***Evaluación de la eficiencia de biomodelos murinos en los ensayos de Genotoxicidad y antigenotoxicidad*** (Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en ciencias de la salud). La Habana, Cuba; Universidad de Ciencias Médicas de la Habana. 2014
3. Arencibia D, Rosario L, Rodriguez Y. ***Assessment of basal and induced DNA damage and Lymphocytes from three mouse lines by means of the alkaline comet assay***. Biotecnología Aplicada. 2011; 28(2):101-105
4. Benjamin M, et al; ***Open Comet: A automated tool for comet assay image analysis***; Redox bio; 2014: 2: 457-465.
5. Blanco Q.A.(2009); Clasificación de las vacunas; *Manual de vacunas de la AEP (84-89)*
6. Cárdenas B.O. et al; ***Exposición a solventes organicos y efectos genotoxicos en trabajadores de fabricas de pinturas en Bogotá***; Rev. Salud publica; 2007, 9(2): 275-288
7. Collins A, Azqueta A, Brunborg G, Gaviao I, Givannelli L, Kruszewski M, Smith C, Stetina R.; Review. ***The comet assay: topical issues***; Mutagenesis. 2008; 23 (Aluja, 2000): 143-151
8. Collins A, Azqueta A, Brunborg G, Gaviao I, Givannelli L, Kruszewski M, Smith C, Stetina R.; Review. ***The comet assay: topical issues***; Mutagenesis. 2008; 23 (Aluja, 2000): 143-151
9. Collins A.R.; Dobson V.L.; Dusinka M.; Kennedy R.S.; ***The Comet assay: What ca it really tell us?***; Mutation Research; 1997; 375, 183-193
10. Corredor C, Guhl F, Duque C (Ed); ***Tendencias y Futuro de la investigación en parasitología y en productos naturales***; Memorias Del Seminario Internacional; 2009; p.43
11. Dhawan A; Bajpayee M; Kumar P; Parmar D; ***Protocol for the single cell gel electrophoresis/ Commets assay for rapid genotoxicty assessment***. ITRC. 1-10

12. Diaz G.C.; ***Mecanismo de Acción de los Fármacos Inmunosupresores***; Revista chilena de reumatología; 2008, 24(2): 73-88.

13. Diaz y Orea et; ***Efecto in vitro de la Vacuna S3Pvac contra cisticercosis en células mononucleares humanas;*** 2013; 56(Flisser, 2001):456-463

14. Fairbairn Q.W.; Olive P.L.; O´Neill K.L.; (1995); ***The comet assay: a comprehensive reviw***; *Mutation Research, 339, 37-59.*

15. Fernanadez R.P.L.; ***Hibridación de ácidos nucleicos: Fundamento Teórico***; Hospital Clínico/ IDIBAPS/Universidad de Barcelona

16. Flisser A, Lightowlers M.; ***Vaccination against Taeniasolium cysticercosis***; MemInstOswaldo Cruz. 2001; 96(Aluja, 2000): 353-356

17. Fuentes Ríos Olivia. "***Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna oral S3Pvac-papaya contra la cisticercosis porcina***". Tesis (Maestría en Ciencias en Investigación Clínica). Ciudad de México, Méx. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. 2011. Obtenido de: http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8110/TESIS%20OLIVIA%20FUENTES.pdf?sequence=1

18. Garrido P.A.; Teijón R. J.M; Blanco G.D.; Villaverde G.C.; Mendoza O.C.; Ramirez R.J.; (2006); Ácidos Nucleicos ADN y ARN; ***Fundamentos de Bioquímica Estructura (261-276)***; 2° ed; Madrid, España.

19. Hartmann A. et al*;* ***Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay;*** Mutagenesis; 2003; 18(Larralde, 2006): 45-51. Obtenido de: http://mutage.oxfordjournals.org/

20. Hernández C, Díaz A.R, Cadena E, Moreno E, Ruiz L, Díaz-Barriga S, Madrigal E. ***Electroforesis unicelular (ensayo cometa) Como bioindicador de antigenotoxicidad Inducida por Amphipterygiumadstringens***. 2° Congreso Nacional de Química Médica

21. Hérnandez M, Cabrera-Ponce J, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García, Rosas G, León-Ramírez C, Juárez P, Sánchez-García G, Cervantes J, Acero G, Toledo A, Cruz C, Bojalil, Herrera-Estrella L, Sciutto E. ***A new highlyeffectiveanticysticercosisvaccineexpressed in transgenic papaya***; Vaccine. 2007; 25: 4252-4260

22. Huerta, M., A. S. de Aluja, G. Fragoso, A. Toledo, N. Villalobos, M. Hernández, G. Gevorkian, G. Acero, A. Díaz, I. Álvarez, R. Ávila, C. Beltán, G. García, J.J. Martínez, C. Larralde y E. Sciutto (2001), "***Synthetic peptide vaccine against Taenia solium pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico***", Vaccine 20(1-2):262-266

23. Klaude M.; Ericksson S.; Nygreen J.; Ahnstrom G.; ***The comet assay: mechanism and technical considerations;*** Mutation Reseaarch; 1996; 363: 89-96.

24. Klug W, Cummings M, Spencer C; Conceptos de Genética; 8° ed; Pearson Education S.A; Madrid 2006

25. Larralde C, Aluja A. (coords); ***Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud***; México FCE, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación mexicana para la salud; 1° Ed; 2006. p.87. Obtenido de: www.*lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s1/CistiBook.pdf*

26. Lee E.; Oh E.; Lee J.; Sul D.; Lee J.; ***Use of the tail moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies;*** Toxicological Science, 2004; 81: 121-132

27. Lieber M.R.; ***The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway;*** Annu Rev Biochem; 2010;79:181-211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.

28. Manual de pruebas de diagnostico y de las vacunas para los animales terrestres; Volumen 1; 2004; OIE. Obtenido de : http://www.oie.int/doc/ged/D6508.PDF

29. Marrero G, Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Curveco D; ***Evaluación Del Efecto Genotóxico De L D-004 En Ratones Nmri Empleando La Electroforesis Alcalina De Células Individuales En Gel (Ensayo Cometa)***; CENIC. 2007. 38 (Aluja, 2000)

30. Martínez M. J., A. S. de Aluja, A. N. M. Villalobos, A. C. Jaramillo y M. Gemmell (1997), "***Epidemiología de la cisticercosis en cerdos de una comunidad rural del estado de Guerrero, México***",Veterinaria México 28:281-286.

31. *Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SSA2-1994. Para la prevención y control del complejo teniasis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica, para quedar como NOM-021-SSA2-1994, Para la prevención y control del binomio teniasis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica*

32. *Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SSA2-1994. Para la prevención y control del complejo teniasis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica, para quedar como NOM-021-SSA2-1994, Para la prevención y control del binomio teniasis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica*

33. Mondragón Salinas Martha Andrea. ***Inducción de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD1 por la vacuna S3Pvac***. (Tesis Licenciatura en Químico Farmacobiológo). Puebla, Méx. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas. 2010.

34. Olive P; Banáth; ***The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells***; Nature Protocols; 2006; 1(Larralde, 2006): 24-29

35. Pareja A, Garcia C, Abad P, Márquez M, ***Estudio in vitro de la citotoxicidad y genotoxicidad de los productos liberados del acero inoxidable 316L con recubrimientos cerámicos bioactivos***; IATREIA; 20: 12-20

36. Prieto E; Llópiz N; ***Normalización de la Electroforesis de Células Individuales (Ensayo Cometa)***; RevCubana InvestBiomed; 1999; 18(Larralde, 2006): 34-6

37. Rangel Sanchéz Jose; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. ;Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana; México 2009 http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Carica%20papaya&id=7744

38. Repetto J.M.; Repetto K.G.; (2009); *Toxicología fundamental*; (4° ed); España; Ediciones Diaz de Santos.

39. Resendiz Ricardo; Cisticercosis cerebral; INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA, MÉXICO 2010 http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencion

apacientes/padecimientos/cisticercosiscerebral.html.

40. Roitt I.M.; Delves P.J.; Martin S.J.; Burtton D.R.; (2006); Profilaxis; En S.N Rondinone, K. Tzal (Eds); ***Inmunología. Fundamentos*** (319-345); Buenos Aires, Argentina; Médica Panamericana.

41. Sarti Elsa; ***La Teniosis y Cisticercosis por Taenia solium***; Salud pública;1997; 39(***3***) http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36341997000300009

42. Sciutto C.E.L. et al; ***Use of the peptide gk-1 expressed in the filamentous phage m13 for preparing pharmaceutical products that increase the effectiveness of the immune response induced by vaccine antigens or pathogens***, EP 2738256 A2; European patent application; 2014,153

43. Sciutto E, et al; ***Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3P-vac) against porcine Taenia solium cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine;*** 2007; 25: 1368-1378

44. Sciutto E, Hernández M, Díaz-Orea A, Cervantes J,Rosas-Salgado G, Morales J, Villalobos N , Aluja A, Blancas A, Aquino R, Fuentes O, Jiménez H, Trejo-Moreno C, Méndez-Martínez M, Manoutcharian K, Gevorkian G, Herrera-Estrella L, Cabrera Ponce J, Larralde C, Fragoso G, Huerta M; ***Towards a practical and affordable oral papaya-basedvaccine: a crucial toolfortaeniasiscysticercosis control programs***; BioprocessSciences. 2011; 13: 325-339.

45. Solari A.J; (2007); ADN y cromosomas; ***Genetica Humana: Fundamentos y Aplicaciones en medicina (55-84)***; 3° ed; 1° reimp, Buenos Aires, Argentina; Médica Panamericana

46. Tay J, Gutierrez M, Lara R, Velasco O. (2010); Parasitología Médica de Tay; (8ª ed); Méndez Editores.

47. Tice R, Vazquez M.; ***Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells***; 1998; ILS. 1-9.

48. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hérnandez M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hérnandez B, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E; ***Two epitopes shared by Taeniacrassiceps and***

Taeniasolium confer protection against murine T. crassicepsCysticercosis along with a prominent T1 response; Infection and Inmunity. 2001; 69 (Aluja, 2000):1766-1773

49. Uribarren Berrueta Teresa; Cisticercosis; Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) 2011 http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cisticercosis.html

50. Walteros D; ***Cisticercosis: Situación de la parasitosis***; Instituto Nacional de Salud. 2009; 1.013.09

51. Wenjuan L.; McNutt M.A.; Wei-Guo Z.; ***The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells;*** Methods; 2009; 48: 46-53.

52. Zuñiga Venegas Liliana A. ***Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorazación humana***. Tesis Doctoral. Bellaterra, Barcelona. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias 2009

18 Anexos.

1. Agarosa Bajo Punto de Fusión: Se prepara con 250 mg de LMPA en 50 ml de PBS se calentará hasta que este cercana al punto de ebullición, y mientras la solución se encuentra así se irá agregando poco a poco la agarosa hasta que se disuelva completamente. Obteniendo una concentración final de 0.5% Una vez que la agarosa está preparada se puede ir colocando en alícuotas de 5 ml y refrigerarla hasta que se necesite. Tay, 2010)

2. Agarosa Punto de Fusión Normal: Se utilizará una concentración de 1 %, así que se disolverá 500 mg de agarosa en 50 ml de PBS previamente calentada se le añadirá la agarosa hasta su completa disolución. Para mantener su temperatura estable se recomienda mantenerla a 37 °C hasta su utilización. Tay, 2010)

3. Solución de Lisis: Para 100 ml. pH final= 10

    - 2.5 M (146.1g) de NaCl
    - 100mM de EDTA (37.2 g)
    - 10 mM Tris (1.2)
    - 1 % de Trinton X-100
    - 10% DMSO

4. Buffer de Electroforesis: pH final= 13
    a. 300 mM de NaOH 10N (200 g / 500 mL de dH_2O)
    b. 1 mM de EDTA (14.89 g / 200 ml de dH_2O)

Solución Final: Para 1000 ml: 30 ml de NaOH (10 N) + 5 ml de EDTA y aforar a 1000 ml.

5. Buffer de Neutralización: 0.4 M tris con ph final de 7.5 (800 ml de H_2O + 48.5 g de Tris y aforar a 1000 ml)

6. Solución de Bromuro de Etidio: Disolver 10 µg de bromuro de etidio en 1 ml de dH_2O. Una vez que la solución está preparada se puede añadir al buffer de neutralización o hacerse la tinción una vez que la electroforesis ha terminado. Evite exponer el reactivo a la luz.

10ug S3Pvac	24 h	48 h	72 h
Células sin daño (5µm)	68.11	55.43	52.09
Bajo Nivel de Daño (6-20µm)	21.87	10.85	15.03
Medio Nivel de Daño (21-40µm)	7.68	4.01	13.69
Alto Nivel de Daño (41-95 µm)	2.00	12.19	13.19
Células Totalmente Dañadas (>95µm)	0.33	17.53	6.01

FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Tabla 3: Porcentaje de frecuencias de acuerdo a las diferentes categorías de daño 10 µg/ kg de la vacuna S3P-vac.

20ug S3Pvac	24 h	48 h	72 h
Células sin daño (5µm)	56.26	68.61	51.09
Bajo Nivel de Daño (6-20µm)	22.20	16.36	21.20
Medio Nivel de Daño (21-40µm)	8.51	12.35	17.20
Alto Nivel de Daño (41-95 µm)	12.52	2.50	6.51
Células Totalmente Dañadas (>95µm)	0.50	0.17	4.01

FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Tabla 4: Porcentaje de frecuencias de acuerdo a las diferentes categorías de daño 20 µg/ kg de la vacuna S3P-vac.

ç

30ug S3Pvac	24 h	48 h	72 h
Células sin daño (5µm)	55.93	65.94	52.25
Bajo Nivel de Daño (6-20µm)	22.54	27.71	16.86
Medio Nivel de Daño (21-40µm)	10.52	5.84	15.19
Alto Nivel de Daño (41-95 µm)	10.18	0.50	12.19
Células Totalmente Dañadas (>95µm)	0.83	0.00	3.51

FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Tabla 5: Porcentaje de frecuencias de acuerdo a las diferentes categorías de daño 30 µg/kg S3P-vac

80 mg/kg CF	24 h	48 h	72 h
Células sin daño (5µm)	49.58	0.00	50.92
Bajo Nivel de Daño (6-20µm)	26.38	0.00	15.36
Medio Nivel de Daño (21-40µm)	10.02	0.83	13.86
Alto Nivel de Daño (41-95 µm)	7.85	10.85	13.69
Células Totalmente Dañadas (>95µm)	6.18	88.31	6.18

FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Tabla 6: Porcentaje de frecuencias de acuerdo a las diferentes categorías de daño Ciclofosfamida 80 mg/kg

Sln. Salina	24 h	48 h	72 h
Células sin daño (5µm)	60.77	57.93	61.77
Bajo Nivel de Daño (6-20µm)	16.53	26.21	17.86
Medio Nivel de Daño (21-40µm)	12.85	11.19	14.69
Alto Nivel de Daño (41-95 µm)	6.84	3.84	4.34
Células Totalmente Dañadas (>95µm)	3.01	0.83	1.34

FUENTE: Datos obtenidos del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina, BUAP.

Tabla 7: Porcentaje de frecuencias de acuerdo a las diferentes categorías de daño vehículo, Sln. Salina (control negativo).