



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL

**Participación de anticuerpos en la protección inducida al péptido GK-1 sobre la  
viabilidad de cisticercos de *Taenia crassiceps*.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA  
SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL

P R E S E N T A

MC. GUADALUPE NÚÑEZ MARTÍNEZ

TUTOR:

DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE-IIB

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ALINE SCHUNEMANN HOFER DE ALUJA- FMVZ

DR. JOSE JUAN MARTINEZ MAYA- FMVZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente: Dra. Guillermina Ávila Ramírez**

**Secretaria: Dra. Edda Lydia Sciutto Conde**

**Vocal: Dra. Irene Patricia del Arenal Mena**

**Vocal: Dra. Yazmin Alcalá Canto**

**Vocal: Dra. María Guadalupe Prado Ochoa**

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mis padres Francisco Núñez Martínez y María del Rosario Martínez Escobar quienes siempre estarán en mi corazón y me seguirán motivando a cumplir todas las metas planteadas!.

Con especial cariño a mis hermanos Víctor Manuel Núñez Martínez y Francisco Núñez Martínez a quienes amo con todo mi ser!

A Felipe Gonzalo Cruz Coronel por formar parte de mi nueva vida y por ser la motivación para seguir creciendo. Te amo!.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a CONACYT por hacer realidad un sueño más.

A mis padres quienes amo eternamente: Francisco Núñez Martínez y María del Rosario Martínez Escobar, por apoyarme en cada momento. Gracias por enseñarme las bases para ser fuerte contra cualquier situación, por enseñarme a nadar sobre corriente, por darme valores y a hacerme creer en mí misma. Gracias por haber sido los mejores papás que pude haber tenido. Gracias por seguir siendo mi motor de vida.

A mis hermanos Víctor Manuel Núñez Martínez y Francisco Núñez Martínez a quienes amo con el corazón. Gracias por estar conmigo en las buenas y malas a pesar de la distancia. Gracias por motivarme a seguir adelante y por tener grandes expectativas sobre mí.

A Felipe Gonzalo Cruz Coronel por la confianza que devolvió en mí y gracias por hacerme ver que es mejor practicar la alegría y a felicidad en todo momento.

A la Dra. Edda Sciutto Conde a quien quiero, admiro y respeto mucho. Gracias por darme la confianza al dejarme trabajar en este proyecto. Gracias por apoyarme para tomar una oportunidad que es la que me mantuvo viva durante mi proceso de duelo. Gracias por creer en mí, porque ni siquiera yo estaba segura de que podría lograrlo. Gracias por apoyarme y facilitarme las cosas para mantener mi trabajo y seguir con el doctorado.

A la Dra. Nelly Villalobos por su participación en el trabajo experimental, pero sobre todo por su amistad. Gracias por brindarme su apoyo incondicional para la candidatura. Gracias por todo su cariño y confianza. La quiero mucho.

A la Dra. Patricia del Arenal por todo su apoyo incondicional, por ser mi amiga, mi cómplice, mi ejemplo a seguir. Muchas gracias por ayudarme a seguir adelante cuando estaba a punto de tirar la toalla. La quiero, respeto y admiro mucho.

A la Dra. Aline S. de Aluja a quien quiero mucho. Gracias por seguir siendo mi ángel de la guarda. Gracias por el conocimiento brindado, el cual me ayuda a ser una gran

persona, antes de ser tutora. Gracias por todo el apoyo que me dio y gracias por ayudarme a tomar una gran decisión en mi vida.

A Paola Herrera por su amistad, cariño y confianza. Gracias por ser mi mano derecha en esta investigación. Gracias por estar conmigo en las buenas y malas. Te quiero mucho Pao!.

A él Dr. José Juan Martínez por darme la oportunidad de salir al mundo laboral aun sin haber terminado. Gracias por su confianza. ¡Se le quiere y admira muchísimo!

A mis compañeros y amigos del laboratorio Alejandra Florentino, Gabriela Meneses, Marisela Hernández, Laura Montero, Marcel Bautista, Diana Herrera, Lisandro Sánchez, Héctor Chapula por su amistad y apoyo, sin cuya valiosa ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Gracias a DGAPA (IG-200414), CONACyT (253891) quien apoyó el Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y beca de investigación IN218816 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM por lo que se les hace un agradecimiento especial.

## ÍNDICE

I. RESUMEN.....	VII
II. ABSTRACT.....	VIII
III. ABREVIATURAS .....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Biología de <i>Taenia solium</i> y <i>Taenia crassiceps</i> .....	3
1.1.1 Taxonomía.....	3
1.1.2. Morfología.....	3
1.1.3. Huevos.....	5
1.1.4. Metacestodos de <i>Taenia solium</i> .....	6
1.1.5. Metacestodos de <i>Taenia crassiceps</i> .....	7
1.1.6. Ciclo de vida.....	8
1.2. Cisticercosis experimental murina.....	12
1.3. Medidas de prevención y control de la cisticercosis por <i>Taenia solium</i> .....	12
1.3.1. Vacunación.....	14
2. HIPOTESIS.....	22
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
4. MATERIAL Y METODOS.....	23
4.1. Estrategia General .....	23
4.2. Producción de anticuerpos en cerdos.....	23
4.3. Detección de anticuerpos por ELISA.....	24
4.4. Purificación de anticuerpos .....	24
4.5. Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .....	25

4.6. Viabilidad de cisticercos para cultivo.....	25
4.7. Método cuantitativo para medir la viabilidad del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> .....	25
4.8. Activación de la vía clásica del complemento con anticuerpos anti-GK-1 .....	26
4.9. Métodos para medir viabilidad de los cisticercos .....	27
4.10. Repertorio de proteínas reconocidas por el péptido GK1 .....	28
4.11. Electroforesis bidimensional de gel de poliacrilamida SDS (2D-PAGE).....	29
4.12. Tinción de proteínas.....	29
4.13. Western blot .....	30
4.14. Estudio ultraestructural.....	30
4.15. Análisis estadístico .....	31
5. RESULTADOS .....	32
5.1. Viabilidad del cisticerco de <i>T. crassiceps</i> mediante la evaluación de citocromo c ...	34
5.2. Activación de la vía clásica del complemento con anticuerpos anti-GK-1 .....	35
5.3. Viabilidad determinada por la motilidad y la exclusión del azul tripano .....	35
5.4. Viabilidad según lo determinado por la medición del citocromo c .....	38
5.5. Evaluación ultraestructural.....	40
5.6. Repertorio de proteínas del cisticerco reconocidas por anticuerpos anti-GK-1 .....	42
6. DISCUSIÓN .....	44
7. BIBLIOGRAFIA .....	48
8. ÍNDICE DE FIGURAS .....	56
9. ÍNDICE DE TABLAS .....	56



## I. RESUMEN

La teniasis-cisticercosis es una zoonosis causada por *Taenia solium*, prevalece en países en vías de desarrollo en donde las condiciones de marginación propician su transmisión. La cisticercosis en el cerdo es un eslabón indispensable para la transmisión, el cual es susceptible a vacunación. En la UNAM se ha desarrollado una vacuna multiepitópica (S3Pvac) elaborada con antígenos recombinantes de *Taenia crassiceps*, contra la cisticercosis porcina. En estudios previos, se observa que anticuerpos contra uno de los componentes de S3Pvac (GK-1) son capaces de dañar al cisticerco de *Taenia solium* inhibiendo su capacidad de transformación a la fase adulta en el intestino de hámster dorado. Este trabajo se diseñó para determinar los mecanismos que median la protección dependiente de anticuerpos anti-GK-1. Para este propósito se produjeron anticuerpos anti-GK-1 en cerdos y se purificaron utilizando proteína A. Análisis proteómicos revelaron que los anticuerpos inducidos reconocían la proteína nativa KE7 y dos proteínas adicionales de *Taenia solium* (endofilina B1 y Gp50). Además, se desarrolló un nuevo procedimiento para evaluar la viabilidad de los cisticercos, basado en la cuantificación del citocromo *c* liberado después del daño del parásito. Dado que los cisticercos de *Taenia crassiceps* tienen la particularidad de reproducirse rápidamente por gemación en la cavidad peritoneal de ratones, además de compartir sus propiedades antigénicas con *Taenia solium*; se decidió cultivar cisticercos de *Taenia crassiceps* con diferentes cantidades de anticuerpos anti-GK-1 y complemento en concentración saturante y sus respectivos controles. La viabilidad de los cisticercos se evaluó registrando la motilidad de los parásitos, la exclusión de azul de tripano, y los niveles de citocromo *c* en el extracto soluble de los mismos. Los anticuerpos anti-GK-1 aumentan significativamente el daño de los cisticercos con los tres procedimientos utilizados. La evaluación de los parásitos por microscopía electrónica después del tratamiento con anticuerpos anti-GK-1 más complemento demostró daño; al observar microtriquias acortadas y desagregadas, e incluso separadas del tegumento; las estructuras osmóticas en forma de punto (glicocalix) se pueden ver adyacentes a microtriquias, en una cantidad menor a los controles. El tegumento exhibe numerosas vacuolas electrolúcidas, con diferentes grados de dilatación. Del mismo modo, los desmosomas están desagregados y con diferentes electrodensidades. Los resultados demuestran que los anticuerpos anti-GK-1 dañan el cisticerco a través de la activación clásica del complemento.

## II. ABSTRACT

Taeniosis-cysticercosis is a zoonosis caused by *Taenia solium*, prevalent in developing countries where the conditions of marginalization favor its transmission. The cysticercosis in the pig is an indispensable link for the transmission, which is susceptible to vaccination. A multi-epitopic vaccine (S3Pvac) prepared with recombinant antigens of *Taenia crassiceps*, against porcine cysticercosis, has been developed at UNAM. In previous studies, it was observed that antibodies against one of its components of S3Pvac (GK-1) are capable of damaging the cysticercus of *Taenia solium*, inhibiting its transformation capacity to the adult stage in the golden hamster intestine. This work was designed to determine the mechanisms that mediate protection against anti-GK-1 antibodies. For this purpose, anti-GK-1 antibodies were produced in pigs and purified using protein A. Proteomic analyses revealed that the induced antibodies recognized the native KE7 protein and two additional *Taenia solium* proteins (endophilin B1 and Gp50). In addition, a new procedure was developed to evaluate the viability of cysticerci, based on the quantification of cytochrome *c* released after parasite damage. Given that the cysticerci of *Taenia crassiceps* have the peculiarity of reproducing rapidly by budding in the peritoneal cavity of mice, in addition to sharing their antigenic properties with *Taenia solium*; it was decided to cultivate *Taenia crassiceps* cysticerci with different amounts of anti-GK-1 antibodies and complement in saturating concentration and their respective controls. The viability of the cysticerci was evaluated by recording the motility of the parasites, the exclusion of trypan blue, and the levels of cytochrome *c* in the soluble extract thereof. Anti-GK-1 antibodies significantly increase the damage of cysticerci with the three procedures used. The evaluation of the parasites by electron microscopy after treatment with anti-GK-1 antibodies plus complement showed damage; when observing shortened and disaggregated microtriquias, and even separated from the tegument; osmotic structures in the form of a point (glycocalyx) can be seen adjacent to microtriquias, in a smaller amount than controls. The tegument exhibits numerous electrolucent vacuoles, with different degrees of dilatation. In the same way, the desmosomes are disaggregated and with different electrodensities. The results demonstrate that anti-GK-1 antibodies damage the cysticercus through classical activation of complement.

### III. ABREVIATURAS

<b>ATM</b>	Viabilidad azul tripano-motilidad
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
<b>BBS</b>	Solución salina tamponada con borato
<b>CCL2</b>	Citocina (quimiocina)
<b>CD4</b>	Cúmulo de diferenciación 4 (del <i>inglés cluster of cuádruple differentiation</i> )
<b>CD8</b>	Cúmulo de diferenciación 8 (del <i>inglés cluster of differentiation</i> )
<b>cDNA</b>	DNA complementario (del <i>inglés complementary deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (del <i>inglés deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamintetraacético (del <i>inglés ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del <i>inglés enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>Fc</b>	Fracción constante
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>LUM</b>	Lectina que se une a manosa
<b>MAC</b>	Complejo de ataque a la membrana
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfatos
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>RPMI-1640</b>	Roswell park memorial institute (por las siglas en inglés)
<b>S3Pvac</b>	Sciutto-tres péptidos-vacuna
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TBP</b>	Proteína de unión a tata
<b>TGR</b>	Tiorredoxina glutatión reductasa
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- alfa
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano-ácido

|

## 1. INTRODUCCIÓN

La teniasis-cisticercosis es una zoonosis causada por *Taenia solium*, endémica en países en vías de desarrollo. Cuando los cisticercos se localizan en el sistema nervioso central humano, pueden causar neurocisticercosis que es la forma más grave de la infección. Si bien se considera que la cisticercosis es erradicable, con frecuencia se informa en la mayoría de los países de América Latina, Asia y África, donde sectores de la población aún sufren altos niveles de marginación. México no es la excepción: la frecuencia de la enfermedad en los últimos diez años sigue presente, según datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, un centro de referencia terciario que brinda servicios a pacientes neurológicos de todo el país (Fleury *et al.*, 2010).

Los metacestodos de *Taenia solium* en los cerdos, son susceptibles de sufrir daño por la respuesta inmune inducida por la cisticercosis misma, Aluja y colaboradores (1996, 1999), observaron que cuando se infectan experimentalmente con huevos del cestodo, los cerdos bien alimentados mantenidos en instalaciones limpias y libres de estrés pueden destruir en un año a la mayoría de los cisticercos establecidos en el músculo esquelético. De hecho, los cisticercos son aún más susceptibles a la inmunidad inducida por la vacunación, como lo muestran Molinari y colaboradores (1986); Lightowlers y colaboradores (1989); Sciutto y colaboradores, (2013), donde varios antígenos del parásito, originalmente derivados de *T. solium* o cestodos relacionados (*T. crassiceps*, *T. saginata*, *T. ovis*) en diferentes etapas del desarrollo (es decir, oncosferas y cisticercos), demostraron reducir la tasa de infección y la carga de parásitos en cerdos vacunados desafiados con huevos de *T. solium* en condiciones experimentales.

A la fecha se han desarrollado tres vacunas S3Pvac-sintético, S3Pvac-fago y Tsol18, las cuales han demostrado su capacidad protectora en condiciones naturales de transmisión (Huerta *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2008; Assana *et al.*, 2010). La vacuna S3Pvac está compuesta por tres péptidos identificados por primera vez en *T.*

*crassiceps*, llamados GK-1, KETc1 y KETc12. GK-1, es un péptido de 18 aminoácidos, que indujo altos niveles de protección contra la cisticercosis murina experimental (Huerta *et al.*, 2001). Notablemente, los niveles de protección más altos en ratones (89% -94%) fueron inducidos por GK-1 sintético (Toledo *et al.*, 2001). Si bien se ha informado que varios candidatos a vacunas son exitosos y se ha evaluado su inmunidad antiparasitaria, gran parte de sus mecanismos de acción permanecen oscuros o inexplorados. La inmunidad provocada por la administración parenteral u oral de GK-1 se estudió en un modelo murino (Toledo *et al.*, 1999, Fragoso *et al.*, 2011), el cual mostró que induce una respuesta humoral y celular exacerbada. Además, los anticuerpos anti-GK-1 pueden dañar los cisticercos de *T. solium*, inhibiendo su desarrollo como se demostró en un modelo experimental de teniasis, en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (García *et al.*, 2001).

En parásitos, se ha demostrado que los anticuerpos del huésped pueden mediar el daño a través de: i) La activación de la vía clásica del complemento. ii) Por otras funciones efectoras de anticuerpos, como ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) por células NK a través del receptor Fc de las inmunoglobulinas. iii) Los receptores de Fc también podrían mediar la destrucción de parásitos mediante la degranulación de eosinófilos y basófilos; estos pueden liberar una mezcla de sustancias proinflamatorias (peroxidasa, histamina, proteoglicanos, serotonina, serina proteasas, etc.) que afectan la viabilidad del parásito. iv) Los receptores de Fc también pueden mediar en la activación de macrófagos y neutrófilos; una vez activadas, ambas células de la respuesta inmune innata pueden producir radicales libres que pueden alterar la homeostasis del parásito (Calderón y Schreiber, 1985; Whiteman y Marciano-Cabral, 1987; Giacomini *et al.*, 2008; Whiteman y Marciano-Cabral, 1989; Hamelmann *et al.*, 1993). Sin embargo, los mecanismos que median el daño a los cisticercos por los anticuerpos anti-GK-1 siguen siendo desconocidos. Un factor limitante para el estudio sobre el daño a los cisticercos en el huésped es la falta de una prueba simple, sensible y precisa para cuantificarlo.

## 1.1. **Biología de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps***

*Taenia solium* y *Taenia crassiceps* son parásitos platelmintos de la clase Cestoda, que viven en el intestino delgado. *Taenia solium* habita en el intestino de los seres humanos y *Taenia crassiceps* en el de carnívoros de la familia *Vulpes*, *Alopex*, *Canis*, *Mustélidos* y *Felis* (Freeman *et al.*, 1973). Ambas tenias presentan una morfología similar (Willms *et al.*, 2003a)

### 1.1.1 Taxonomía

**Reino:** Animalia

**Filo:** Platyhelminthes

**Clase:** Cestoda

**Orden:** Cyclophyllidea

**Familia:** Taeniidae

**Género:** *Taenia*

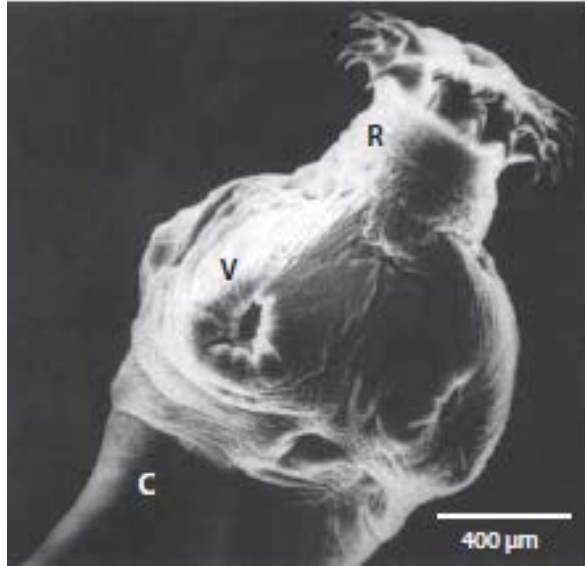
**Especie:** *T. solium*/*T. crassiceps*

### 1.1.2. Morfología

La *T. solium* presenta un cuerpo largo y aplanado dorso ventralmente, cuya longitud aproximada es de 1.5 a 5 metros. Esta provista de un tegumento o epitelio que le permite absorber los nutrientes del medio. Willms y colaboradores (2003a) mencionan que su cuerpo se divide en:

#### a) **Escólex o cabeza**

Posee cuatro ventosas y rostelo coronado por dos hileras de ganchos. El número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 32, y su tamaño entre 159 y 173  $\mu\text{m}$  (media  $165.7 \pm 5.0 \mu\text{m}$ ). Tanto las ventosas como el róstelo son estructuras de fijación que capacitan a la *Taenia* para mantenerse anclada en la pared del intestino delgado (yeyuno) de su hospedero (Figura 1).



**Figura 1.** Escólex de *Taenia solium* c: cuello, R: rostelo, V: ventosas (Larralde y Aluja, 2006).

### **b) Cuello**

Está en la parte inferior del escólex y es a partir de aquí que se producen los proglótidos o segmentos, como se muestra en la Figura 2.

### **c) Estróbilo**

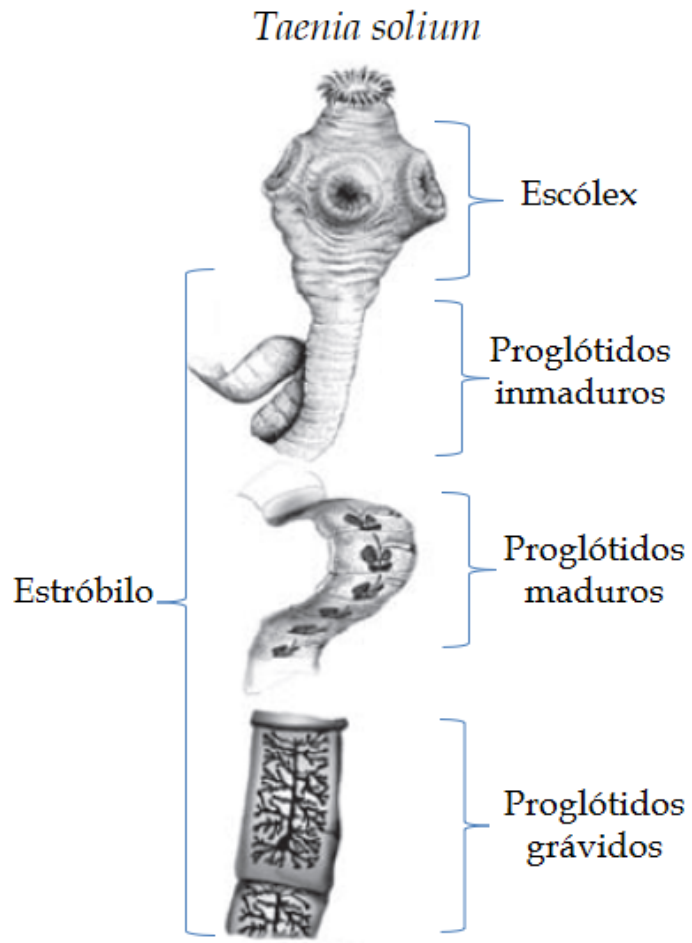
El cuerpo de la *T. solium* se clasifica de acuerdo con el grado de madurez en:

- Proglótidos inmaduros que se localizan por debajo del cuello, son los más jóvenes e indiferenciados, de tamaño variable y sin órganos sexuales desarrollados.
- Proglótidos maduros que se encuentran en la parte media del estróbilo, cada uno posee órganos reproductores masculinos y femeninos (es un parásito hermafrodita). Los genitales masculinos están constituidos por un gran número de testículos (275 a 575) que se anastomosan en un conducto genital que desemboca por un costado en el atrio genital del proglótido. Los órganos reproductores femeninos están constituidos por un ovario aparentemente trilobulado situado en la base del útero en el extremo posterior del proglótido. El ovario desemboca a través de la vagina en el atrio genital. El útero en los



proglótidos grávidos de *T. solium*, muestran entre 7 y 11 ramas que nacen de un útero central.

- Proglótidos grávidos son los más alejados del escólex, muestran un útero “grávido” ramificado y lleno de huevos (~ 50.000 en cada uno). Generalmente miden de 7 a 12 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho.



**Figura 2.** Estructura de *Taenia solium*, modificado de (Larralde y Aluja, 2006).

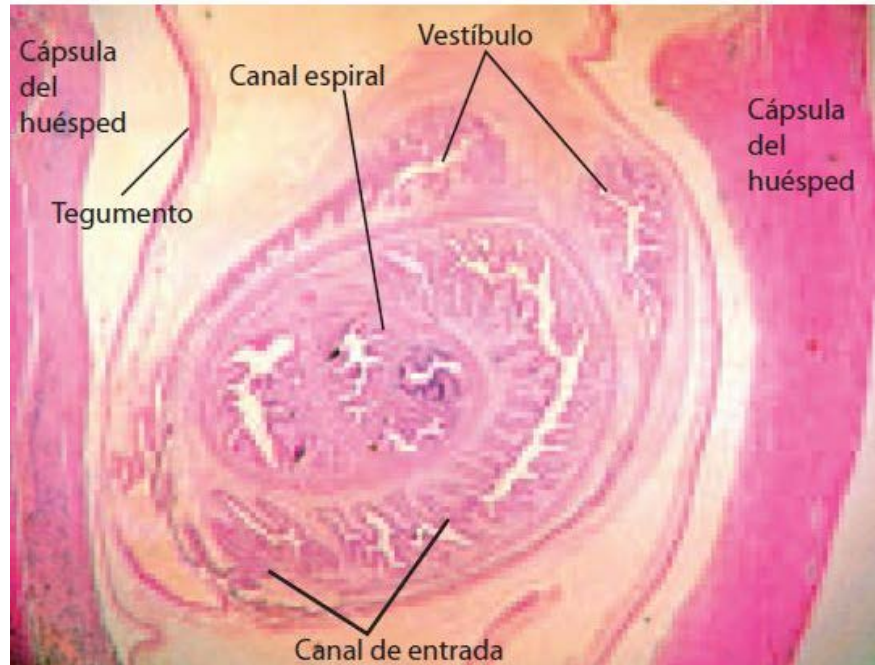
### 1.1.3. Huevos

Los huevos de *Taenia* son esféricos y con apariencia radial y miden 20-40µm, contienen una oncosfera o embrión con seis ganchos pequeños (Laclette *et al.*, 1982).

#### **1.1.4. Metacestodos de *Taenia solium***

El cisticerco de *T. solium* es una vesícula ovalada y translúcida, llena de líquido y mide de 0,5 a 2 centímetros de largo, dotada de un pequeño escólex en su interior. Al igual que la *Taenia* adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y dos hileras de ganchos. La estructura histológica se muestra en la figura 3 y se compone del tegumento que es la zona de contacto del parásito con el huésped, desempeña un papel central en el mantenimiento de la interacción huésped-parásito. La superficie del tegumento le sirve a la larva para obtener sus nutrientes y excretar sus desechos, ya que carecen de tracto digestivo, esta superficie externa presenta una membrana plasmática y microtricas, estructuras parecidas a las microvellosidades del intestino con función de absorción (Rodríguez-Contreras *et al.*, 1998).

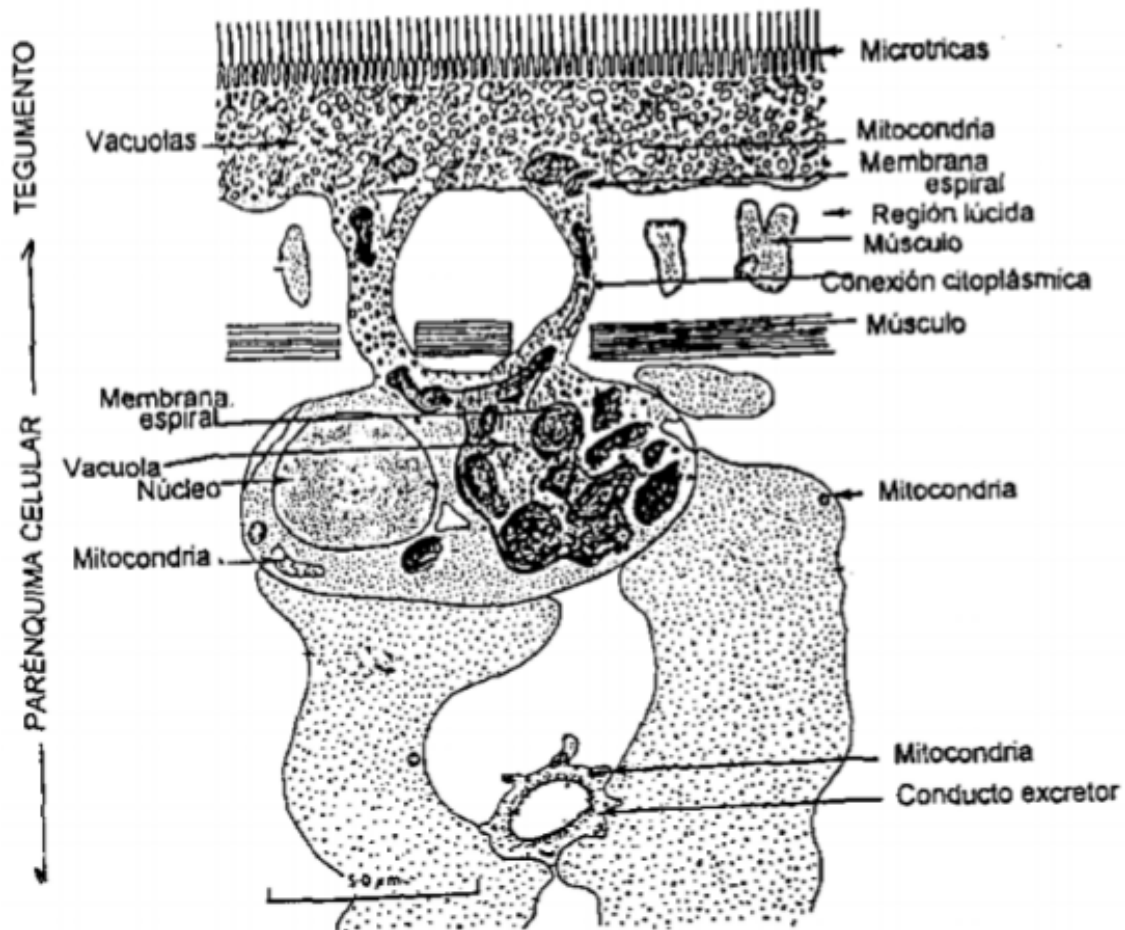
Por debajo del tegumento se encuentran varias capas de tejido muscular liso, así como los llamados citones subtegumentales. Estas células sintetizan activamente proteínas y otros componentes que posteriormente son transportados hacia el tegumento a través de puentes citoplásmicos. Se han descrito proteínas del citoesqueleto, como la miosina tipo II, y la actina, la cual se encuentra en siete isoformas diferentes. A mayor distancia de la superficie se encuentra una serie de conductos o canales, aparentemente relacionados con células ciliadas, llamadas células flama, que constituyen un sistema protonefridial. *T. solium* produce concreciones minerales denominadas corpúsculos calcáreos que se forman en el lumen de los ductos protonefridiales y no intracelularmente como se ha descrito para otros cestodos. Debido a su localización, es probable que dichos corpúsculos participen en procesos de desintoxicación. Cabe notar que todos los elementos celulares por debajo del tegumento se distribuyen en forma poco organizada y sincicial en medio de un abundante tejido conectivo parasitario (Willms *et al.*, 2003b).



**Figura 3.** Corte histológico del metacestodo de *Taenia solium* (Flisser *et al.*, 2004)

#### **1.1.5. Metacestodos de *Taenia crassiceps***

El metacestodo de *Taenia crassiceps* es similar al de *T. solium*. En la figura 4 se muestra que tiene dos capas en su estructura, una externa (tegumento) que le sirve de protección y además le ayudan a la absorción de nutrientes y otra interna (formada por parénquima celular), entre ambas capas se encuentran fibras musculares, corpúsculos calcáreos, una red neuronal sencilla y un grupo de células germinales (Smyth, 1989)



**Figura 4.** Microscopia electrónica del metacestodo de *Taenia crassiceps* (Baron, 1968).

### 1.1.6. Ciclo de vida

#### 1.1.6.1. *Taenia solium*

El ser humano es el huésped definitivo de *T. solium*, la cual habita en el intestino delgado. Al defecar, una persona infectada expulsa en las heces los segmentos grávidos desprendidos espontáneamente por el gusano adulto (en promedio de 4 o 5 por día), los cuales contienen aproximadamente 50,000 huevos cada uno. La primera expulsión de proglótidos ocurre de 2 a 3 meses después de la infección con el metacestodo (Silverman, 1954). El cerdo al consumir heces contaminadas con proglótidos grávidos, éstos al llegar al intestino delgado, las enzimas proteolíticas y sales biliares, activan el embrión hexacanto contenido en cada huevo, los embriones

activados penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar capilares sanguíneos que los distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejidos subcutáneo, músculo esquelético y cardíaco, hígado, cerebro, ojos, entre otros.) formándose los cisticercos en 10 semanas aproximadamente. El ciclo se completa como se muestra en la figura 5, cuando el humano consume la carne de cerdo con metacestodos viables presentes. Las sales biliares y enzimas proteolíticas provocan la evaginación del escólex del cisticerco, el cual se fija en la pared intestinal. Una vez anclado el parásito crece y se diferencia hasta *Taenia* adulta productora de proglótidos grávidos (Willms et. al., 2003b).

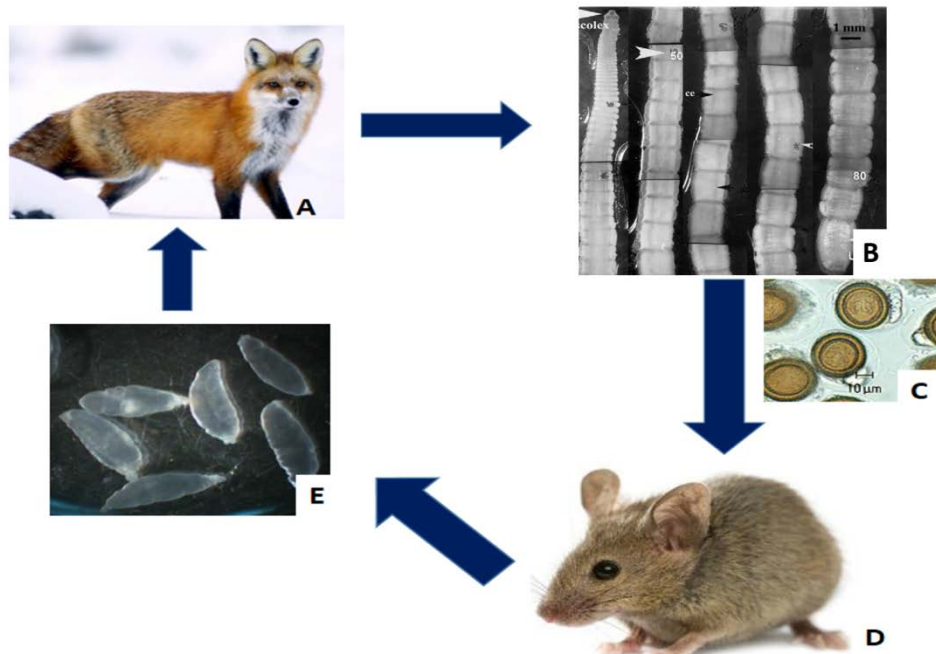
## CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*



**Figura 5.-** Ciclo de vida de *Taenia solium*. El humano es el huésped definitivo, libera en las heces proglótidos grávidos que contienen huevos maduros; el cerdo al consumir las heces infectadas desarrolla los cisticercos y si el humano consume carne de cerdo con cisticercos viables se desarrolla la *Taenia solium* en su intestino delgado, cerrándose el ciclo (flechas naranjas). Por otro lado, si el humano consume huevos en alimentos o agua contaminada, desarrolla cisticercos, principalmente en el cerebro (flechas amarillas). En resumen si el humano consume huevos de *Taenia solium* tendrá cisticercosis y si consume cisticercos tendrá teniasis.

### 1.1.6.2. *Taenia crassiceps*

La *Taenia* se aloja en el intestino delgado del cánido, y una vez madura produce y libera miles de huevos al medio a través de las heces. Los huevos son ingeridos de manera accidental por roedores, los hospederos intermediarios, en donde se desarrollarán a cisticercos, alojándose en diferentes cavidades del roedor (Willms y Zurabian, 2010). En los roedores naturalmente infectados, los cisticercos se instalan subcutáneamente cerca de la axila, en la caja torácica, o en el cuello, y con menor frecuencia entre la escápula o en la región inguinal. El ciclo se completa cuando las larvas son ingeridas por un huésped definitivo carnívoro donde la *Taenia* crecerá en el duodeno como se muestra en la figura 6 (Freeman *et al.*, 1973).



**Figura 6.** Ciclo de vida silvestre de *T. crassiceps* (A) Huésped definitivo; (B) Gusano adulto en el intestino del huésped; (C) Huevos infecciosos liberado en las heces; (D) Ingestión de huevos por el huésped intermedio; (E) Las larvas crecen en un huésped intermedio y son ingerido por un huésped definitivo carnívoro donde la *Taenia* crecerá en el duodeno (Willms y Zurabian, 2010).

## **1.2. Cisticercosis experimental murina**

La cisticercosis murina es un modelo experimental sencillo para la cisticercosis porcina, considerando las dificultades económicas y experimentales se presentan en la investigación con cerdos, este modelo ha resultado ser adecuado para avanzar en el conocimiento de los factores inmunológicos (Terrazas *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999), genéticos (Sciutto *et al.*, 1991; Fragoso *et al.*, 1996, 1998) y sexuales (Bojail *et al.*, 1993, Larralde *et al.*, 1995) implicados en la resistencia y/o susceptibilidad a la cisticercosis. A diferencia de *T. solium*, los cisticercos de *T. crassiceps* tienen la particularidad de reproducirse rápidamente por gemación polar múltiple en la cavidad peritoneal de ratones (Freeman, 1962). Las similitudes que presentan ambos cestodos en el ciclo de vida, estadios de desarrollo y las similitudes antigénicas, permitió identificar diferentes antígenos para la elaboración de la vacuna S3Pvac (Larralde *et al.*, 1989; Manoutcharian *et al.*, 1995).

Otra ventaja de este modelo es la medición de carga parasitaria, es decir, la cantidad de parásitos (cisticercos de *T. crassiceps*) recuperados puede utilizarse como un parámetro de susceptibilidad a ser modificado por vacunación o cualquier otro tratamiento.

## **1.3. Medidas de prevención y control de la cisticercosis por *Taenia solium***

La taeniasis y la cisticercosis es una zoonosis que representa un problema de salud pública en países en desarrollo en las que las condiciones sociales, económicas y culturales favorecen el ciclo de transmisión por lo que se han propuesto diferentes estrategias como medidas de prevención y control de esta parasitosis.

### **1) Tratamiento masivo para eliminar a los portadores teniásicos:**

- a) La niclosamida actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos más susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del hospedero, pero no parece tener acción sobre los huevos, ni contra los cisticercos. El uso de este medicamento puede aumentar la infección del ambiente y el riesgo potencial de contraer cisticercosis, pues destruye los proglótidos y libera



los huevos aparentemente viables al medio (Garattini *et al.*, 1982, Bundy *et al.*, 1990).

- b) El praziquantel es el medicamento más utilizado en los tratamientos masivos, y aunque no se conoce bien su mecanismo de acción, se sugiere que lesiona el tegumento del parásito adulto y de la larva interfiriendo con los canales iónicos, principalmente del calcio (Botero *et al.*, 1982). Sin embargo, en una comunidad del Estado de Guerrero de 1500 habitantes la cisticercosis porcina aumentó casi al doble un año después de haber suministrado praziquantel a la población (Keilbach *et al.*, 1989).

## 2) **Tratamiento masivo con otras posibles estrategias:**

La aplicación de campañas de educación para la salud con énfasis en el conocimiento de la existencia de la teniasis/cisticercosis y los factores que la predisponen. Para este propósito de 1993 a 1995 en tres comunidades rurales de Morelos, se evaluaron a corto plazo (seis meses) dos estrategias de intervención (tratamiento masivo con praziquantel y educación para la salud). Los resultados más importantes muestran que en la comunidad donde se ofreció tratamiento masivo se logró una reducción importante de la teniasis, pero no de la contaminación ambiental medida por la frecuencia de cisticercosis porcina. Mientras tanto, en la comunidad que recibió educación para la salud se observaron reducciones importantes tanto de la teniasis como de la cisticercosis porcina. En la comunidad que recibió tratamiento masivo y educación para la salud se encontró una reducción importante de la infección humana con resultados discordantes en contaminación ambiental (Sarti *et al.*, 1997, 2003, Flisser *et al.*, 2003).

## 3) **Vacunas contra la cisticercosis porcina:**

Las estrategias de vacunación se han enfocado en el control de la cisticercosis porcina como hospedero intermediario, como se explica más ampliamente en el siguiente apartado.

### 1.3.1. Vacunación

Como se mencionó anteriormente, se han desarrollado varias vacunas (ver tabla 1) para inmunizar al cerdo (hospedero intermediario) con el propósito de disminuir la incidencia de la enfermedad en el cerdo y en el humano. Estas vacunas han sido probadas experimentalmente ya sea con cerdos o con ratones y a nivel de campo, directamente en las comunidades en donde se ha presentado este problema.

**Tabla 1. Vacunas contra la cisticercosis por *Taenia solium***

<b>Referencia</b>	<b>Vacuna</b>	<b>Desafío</b>	<b>% de protección</b>
<b>Molinari <i>et al.</i>, 1993</b>	<b>Extracto crudo del cisticerco de <i>T. solium</i></b>	<b>Experimental</b>	<b>86</b>
<b>Nacimiento <i>et al.</i>, 1995</b>	<b>Extracto de escólex del cisticerco de <i>T. solium</i></b>	<b>Experimental</b>	<b>71.4</b>
<b>Manoucharian <i>et al.</i>, 1996</b>	<b>Fluido vesicular, cisticercos de <i>Taenia solium</i></b>	<b>Experimental</b>	<b>96</b>
<b>Molinari <i>et al.</i>, 1997</b>	<b>Extracto del escólex del cisticerco de <i>T. solium</i></b>	<b>Campo</b>	<b>82</b>
<b>Plancarte <i>et al.</i>, 1999</b>	<b>Antígeno recombinante de oncosferas de <i>T. ovis.</i></b>	<b>Experimental</b>	<b>93</b>
<b>Huerta <i>et al.</i>, 2002</b>	<b>Péptidos sintéticos KETc-1, 12 y GK-1</b>	<b>Campo</b>	<b>97.9</b>
<b>Manoucharian <i>et al.</i>, 2003</b>	<b>Fagos filamentosos</b>	<b>Experimental</b>	<b>87</b>

(Díaz-Orea, 2004)

### 1.3.1.1. Antecedentes de la Vacuna s3pvac

El modelo murino ha aportado la identificación de antígenos protectores presentes en un extracto antigénico total de cisticercos de *T. crassiceps* mediante una separación electroforética, obteniéndose 12 fracciones antigénicas (8-220 KDa), las cuales fueron utilizadas para evaluar su capacidad protectora en ratones. De estas doce fracciones, sólo 8 mostraron un efecto significativo en la reducción de la carga parasitaria en ratones inmunizados con respecto a los controles. Se seleccionaron solo tres fracciones antigénicas (56, 66, 74 KDa) para reevaluar su capacidad protectora basados en la mayor protección obtenida independiente de la dosis empleada. Los resultados mostraron que la inmunización con estas tres fracciones redujo significativamente la carga parasitaria, al mismo tiempo que fueron reconocidos por sueros humanos y cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* (Valdez *et al.*, 1994). Estas fracciones también fueron empleadas como inmunógenos en el cerdo, obteniéndose una disminución del 98% de parásitos, confirmando así su capacidad protectora (Manoutcharian *et al.*, 1995).

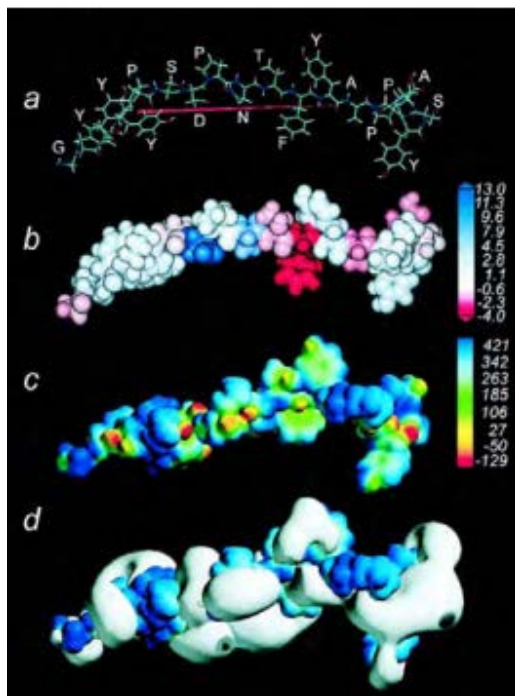
Con el propósito de disponer de cantidades adecuadas de estas fracciones para su empleo extenso en programas de vacunación, se decidió producirlos mediante técnicas de DNA recombinante. Para esto se construyó una librería de cDNA en el bacteriófago  $\lambda$ ZAP empleando mRNA aislado de cisticercos de *T. crassiceps*, seleccionando trece colonias que fueron identificadas por medio de inmunodetección, empleando anticuerpos policlonales específicos en contra de las fracciones antigénicas protectoras de 56, 74 y 66 KDa. De las clonas identificadas se seleccionaron aquellas que también fueron reconocidas por sueros de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium*, con el fin de asegurar que las clonas codificaban para antígenos compartidos por ambos cestodos. Las clonas se denominaron KETc1, KETc4, KETc7, KETc 11 y KETc12 (Manoutcharian *et al.*, 1995, 1996). Los antígenos codificados por estas clonas se evaluaron en el modelo murino, encontrándose diferentes niveles de protección en cuatro de las clonas utilizadas (KETc1, KETc4, KETc7 y KETc12). Posteriormente, con base en las secuencias de los

antígenos recombinantes denominados KETc1, KETc7 y KETc12, se procedió a identificar las secuencias inmunogénicas. Así se encontraron los epítopes GK1, KETC1 y KETc12, cuya capacidad protectora ha sido evaluada, encontrándose diferentes niveles de protección contra la cisticercosis murina (Toledo *et al.*, 1999, 2001) y porcina (Huerta *et al.*, 2001). Con base en los estudios anteriores, se desarrolló una versión de vacuna sintética S3Pvac, que está compuesta por los tres péptidos KETc1, GK1 y KETc12. Esta vacuna ha sido evaluada en campo encontrando una reducción del 50% en el número de cerdos infectados y del 98% en el número de parásitos instalados (Huerta *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la vacuna tiene propiedades terapéuticas siendo capaz de destruir los cisticercos instalados en forma experimental (Aluja *et al.*, 2005).

#### **1.3.1.2. Péptido GK1**

GK1 fue identificado a partir de un antígeno recombinante de *T. crassiceps* llamado KETc7, que ha demostrado ser efectivo como vacuna contra la cisticercosis experimental murina. Basados en la deducción de la secuencia de aminoácidos de este polipéptido rico en prolina, se sintetizaron químicamente 3 fragmentos llamados: GK-1, GK-2 y GK-3; de los cuales, únicamente GK1 incluye epítopes protectores contra cisticercosis murina. GK1 es una secuencia de 18 aminoácidos (G-Y-Y-Y-P-S-D-P-N-T-F-Y-A-P-P-Y-S-A) que ha demostrado tener la habilidad de inducir una respuesta de anticuerpos (Figura 7) (Manoutcharian *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 1999). En su evaluación dentro de un modelo de infección murina, GK-1 protegió al 97% de los ratones infectados. En este mismo trabajo se determinó por inmunolocalización que este péptido se encuentra presente en el tegumento de *T. crassiceps*, así como en los huevos, cisticerco y adulto de *T. solium*. Estudios fisicoquímicos de GK-1 demostraron que tiene propiedades adecuadas para ser un epítope protector (Toledo *et al.* 1999). El hecho de que GK-1 cuente con una dualidad hidrofílica-hidrofóbica le puede conferir una mayor facilidad para interactuar con membranas celulares de linfocitos B y T. Los grupos aromáticos intercalados que

forman enlaces no covalentes podrían optimizar su presentación. Por medio de programas computacionales se determinó que este péptido interactúa con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I.



**Figura 7.** Estructura del péptido GK-1 (a) Geometría optimizada; (b) Se muestran las regiones hidrofóbicas (rojo) e hidrofílicas (azul); (c) Densidad electrónica donde los átomos de oxígeno se muestran en rojo, mientras que las zonas negativas correspondientes a pares de electrones solitarios en átomos se muestran como amarillas y (d) su potencial electrostático (Toledo *et al.*, 1999).

### 1.3.1.3. Inmunidad inducida por GK1

GK1 induce un alto nivel de protección contra la cisticercosis sin la necesidad de un adyuvante (Toledo *et al.*, 1999).

GK1 es capaz de estimular la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> y en menor grado células T CD4<sup>+</sup>. Se ha observado que el sobrenadante de células estimuladas con GK1 contiene altos niveles de IFN- $\gamma$  y bajos niveles de IL-4. Estos resultados son similares a los obtenidos por citometría de flujo, cuando se midió la producción de citocinas en células T. Los altos niveles de IFN- $\gamma$  promovida por la inmunización con GK1, señalan su capacidad potencial de inducir un proceso inflamatorio (Toledo *et.*

*al.*, 1999). Además, se ha demostrado que GK1 usado en combinación con LPS, estimula la producción de IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), así como la respuesta inmune al inducir la secreción de CCL2, una quimiocina proinflamatoria que atrae monocitos, células asesinas naturales (NK), CD inmaduras y células T activadas a los ganglios linfáticos que drenan al sitio de inmunización (Segura *et al.*, 2009).

#### 1.3.1.4. Probable mecanismo de daño GK1

Se ha demostrado que los anticuerpos contra GK1 inducidos por vacunación en cerdos pueden dañar los cisticercos, interrumpiendo su transformación como se demostró en un modelo experimental de teniasis en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (García *et al.*, 2001). Sin embargo, los mecanismos que median el daño a los cisticercos por los anticuerpos anti-GK-1 siguen siendo desconocidos.

Se ha demostrado que los anticuerpos pueden mediar el daño parasitario a través de la activación de la vía clásica del complemento (Calderón y Schreiber, 1985; Whiteman y Marciano-Cabral, 1987). El complemento es activado, tanto en su vía clásica como en la alterna, bajo la presencia de algunos parásitos, resultando en la muerte del parásito por lisis (Hamelmann *et al.*, 1993). Por esta razón algunos autores han estudiado la activación del complemento en distintos parásitos como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.-Citotoxicidad dependiente del complemento**

<b>Autor</b>	<b>Parasito estudiado</b>
Moska <i>et al.</i> ,1988	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Whiteman <i>et al.</i> ,1989	<i>Naegleria fowleri</i>
Lindani <i>et al.</i> , 2018	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Van Beek <i>et al.</i> , 2018	<i>Plasmodium falciparum</i>

El sistema del complemento es uno de los componentes principales de la respuesta inmunitaria y sirve como un mecanismo efector de reconocimiento de la inmunidad humoral (William, 1993). Está compuesto por más de 30 proteínas en el plasma y en la superficie de las células, dentro de las cuales hay proteasas, inhibidores, inactivadores y receptores. La concentración de las proteínas del complemento en el plasma es de más de 3 g/L y constituye aproximadamente el 15% de la fracción de globulina (Lezama, 2007)

Actualmente se reconocen tres vías de activación del complemento (Figura 8); éstas son la vía clásica, dependiente de complejos antígeno-anticuerpo o por la proteína C reactiva; la vía alterna, iniciada por sustancias localizadas en la superficie de microorganismos y la vía de las lectinas que se une a la manosa (LUM) (Bonilla y Rondón, 2011).

La vía clásica comienza cuando el anticuerpo se une a la superficie celular y termina con la lisis de la célula. La activación del complemento se inicia cuando dos o más fragmentos Fc de los anticuerpos en los complejos inmunes reaccionan con el componente C1; la interacción ocurre a través del subcomponente C1q, requiriendo para ello al menos una molécula de IgM o dos moléculas de IgG situadas en estrecha proximidad. C1 está constituido por 3 subcomponentes (una proteína C1q, dos de C1r y dos de C1s, unidas entre sí por iones de calcio). C1r y C1s son proenzimas que al activarse (al unirse el C1q a los fragmentos Fc de los anticuerpos), adquieren actividad de proteasa. C1r actúa sobre C1s y este sobre C4 y C2, sus sustratos moleculares. Los productos formados son C4b, C2a y dos péptidos pequeños (C4a y C2b). C4b se une firmemente a la superficie del antígeno e incluso al anticuerpo, y junto con C2a, en presencia de magnesio, forman un complejo enzimático con actividad de C3 convertasa. La C3 convertasa hidroliza a C3, generando C3b y C3a. El fragmento C3b se une a la C3-convertasa para dar origen a la convertasa de C5 (C4b2a3b), la cual hidroliza a C5 produciendo un fragmento grande (C5b) y un péptido pequeño (C5a). C3a y C5a son péptidos con efectos biológicos diversos. Cada componente o complejo enzimático activado modifica a muchas moléculas que le

sirve de sustrato, de manera que la activación de una sola molécula de C1 culmina con la activación de cientos de miles de moléculas de los últimos componentes del complemento en un fenómeno biológico de activación en cascada, el complejo de ataque a la membrana. El daño celular es causado por el complejo de ataque a la membrana (MAC), el cual está formado por los componentes C5b, C6, C7, C8 y un polímero de C9. En los eritrocitos, la formación del MAC ocurre cuando el complejo C5b6 interacciona con fosfolípidos, gangliósidos y ácido siálico de la membrana celular. Esto propicia alteración en la estructura de la membrana que facilitan la penetración parcial de C8 y la polimerización e inserción de C9. El MAC causa la destrucción lítica de las células al favorecer la desorganización de los lípidos de la membrana y al producir en ella poros o agujeros a través de los cuales ocurre la salida y entrada de agua, iones y macromoléculas (Berron *et al.*, 2003)



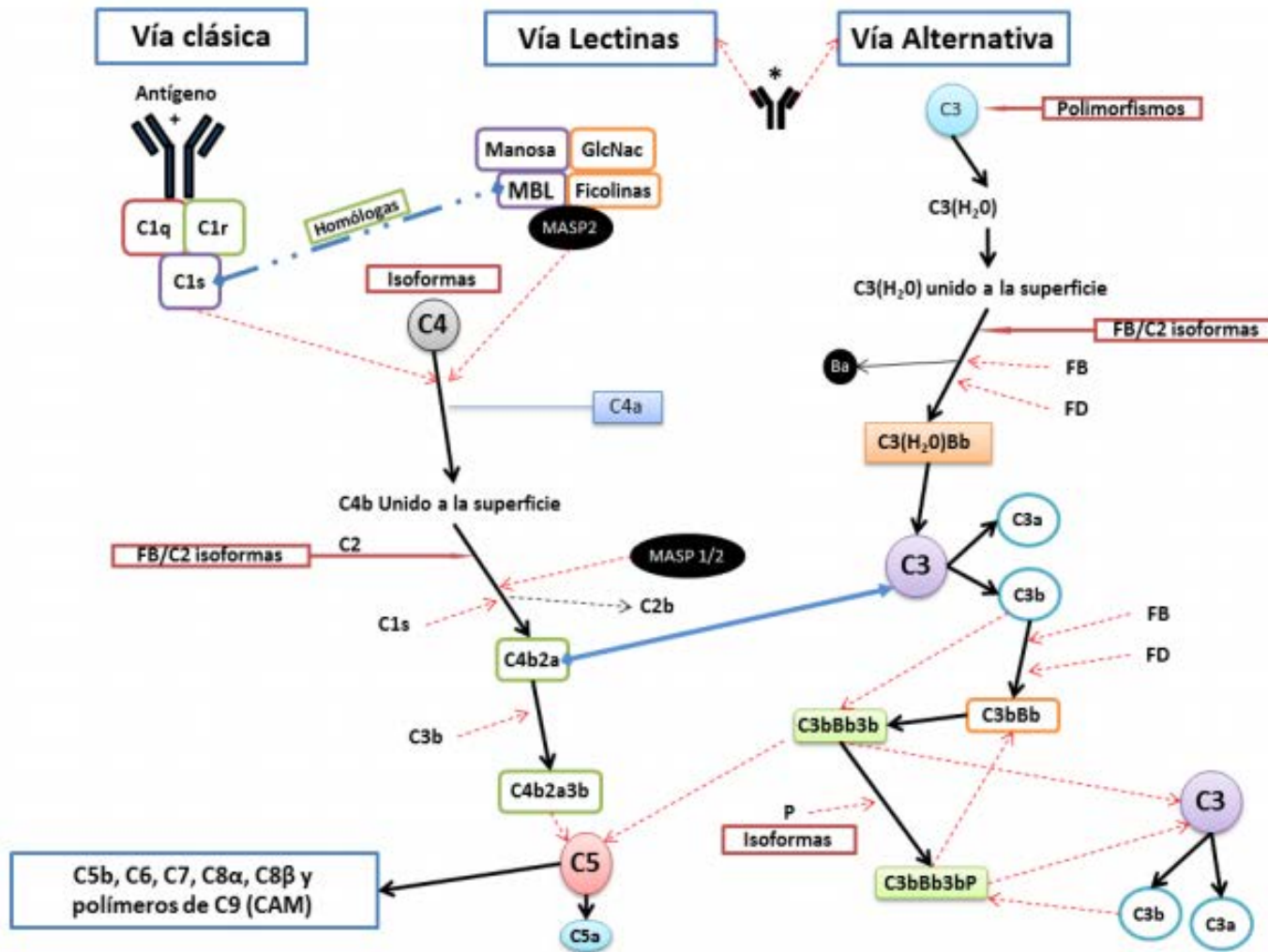


Figura 8. Esquema de las vías de activación del complemento (Bonilla y Rondón, 2011).

## **2. HIPOTESIS**

Los anticuerpos inducidos por la inmunización de cerdos con el péptido GK-1, el cual es un constituyente de la vacuna S3Pvac-sintética, activan la vía clásica del complemento y dañan a los cisticercos de *Taenia crassiceps*

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

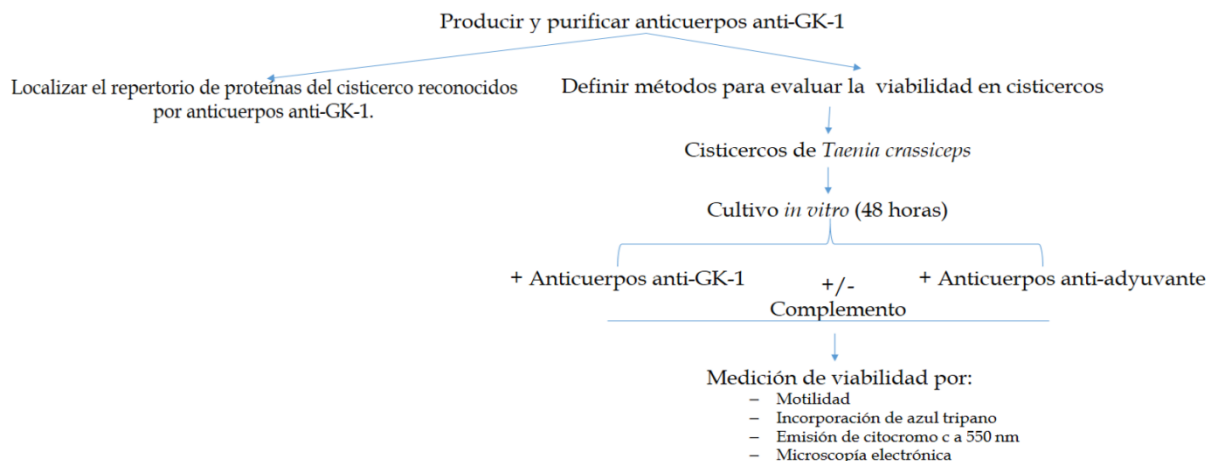
Evaluar el daño a los metacestodos de *Taenia crassiceps* mediado por anticuerpos anti-GK-1 en presencia del complemento.

### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Producir y purificar anticuerpos anti-GK-1 en cerdos.
- Desarrollo y validación de un método cuantitativo para medir la viabilidad de cisticercos de *Taenia crassiceps*.
- Evaluar el efecto de los anticuerpos anti-GK1, mediada por la fijación de complemento en cisticercos de *Taenia crassiceps*.
- Localizar el repertorio de proteínas del cisticerco reconocidos por anticuerpos anti-GK-1.

## 4. MATERIAL Y METODOS

### 4.1. Estrategia General



### 4.2. Producción de anticuerpos en cerdos

Seis cerdos de la raza York-Landrace, de 3 meses de edad sanos, se compraron en la granja de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicada en Jilotepec, Estado de México, se trasladaron a la Ciudad de México para ser mantenidas en la unidad de confinamiento de cerdos que se encuentra en la FMVZ de la UNAM, con buena alimentación y limpieza para prevenir infecciones.

Tres cerdos fueron inmunizados seis veces con 250 µg de GK-1 más adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) (anticuerpos anti-GK1: ac-anti-GK1) en la base de la oreja por vía subcutánea, cada dos semanas. Los otros tres cerdos fueron inmunizados únicamente con el adyuvante de Freund incompleto (anticuerpos control: ac-control), de manera similar. El adyuvante completo de Freund se empleó solo en la primera inmunización en los dos grupos y posteriormente el adyuvante de Freund incompleto.

A fin de evaluar la formación de anticuerpos, a cada cerdo se le tomaron cuatro ml de sangre de la vena yugular externa, mediante punción intravenosa antes de la inmunización y en diferentes días (0, 15, 30, 45, 60) para evaluar el nivel de anticuerpos en los cerdos un día antes de la siguiente inmunización. Se utilizó el

sistema de recolección de sangre S-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), equipado con una aguja amarilla de 1,5 pulgadas. Después de la coagulación, las muestras de sangre se centrifugaron (centrifuga DESAGA Sarstedt-Gruppe, Zentrifuge L-12) a 2500 x g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el suero y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **4.3. Detección de anticuerpos por ELISA**

Los niveles de anticuerpos en suero se determinaron mediante la técnica de ELISA indirecto, utilizando el péptido GK-1 como fuente de antígeno, siguiendo un procedimiento descrito previamente por Sciutto y colaboradores en 1998. Después de la incubación con 100 µl de péptido GK-1 (1µg/µl) en solución salina tamponada con boratos (BBS), pH 9.6, durante 60 minutos a 37°C, los pozos se lavaron tres veces con PBS, después se incubaron con 200µl de PBS-BSA para bloquear durante 60 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo se lavaron nuevamente los pozos e incubaron con 100 µl de suero de cerdo diluido 1:100 en PBS-Tween durante 60 min a 37° C. Los anticuerpos se detectaron al incubar el suero durante 60 minutos a 37°C con 100 µl de conjugado de IgG e IgG1 anti-cerdo acoplado a peroxidasa, diluido 1:1000, paso seguido, se lavaron los pozos, se colocaron 100 µl de sustrato TMB directo. La reacción de color se detuvo usando 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2N. Los valores de absorbancia se midieron a 405 nm en un lector de ELISA (Human GMBH, Humareader Model 2106, Wiesbaden, Alemania). Una muestra de suero se consideró positiva cuando la lectura de densidad óptica (OD) excedió el intervalo de confianza del 99% (valor medio de control (no inmunizado) +3 desviaciones estándar).

### **4.4. Purificación de anticuerpos**

Los anticuerpos se purificaron con el kit de purificación de IgG total Protein A de Pierce (Thermo Scientific, Waltham, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se equilibró la columna con 3 ml del buffer, posteriormente se colocaron 5 ml de suero con anticuerpos los que se conservaron en agitación suave por 2 hrs a temperatura ambiente. Al término de ese tiempo se dejó que el suero con anticuerpos

fluyera a través de la columna. Por último, se hicieron lavados con 10ml del buffer, colectando en fracciones de 2 ml cada uno para medir absorbancia a 280.

#### **4.5. Cisticercos de *T. crassiceps***

La cepa ORF de *T. crassiceps*, aislada por Freeman (1962) y suministrada por B. Enders (Behringwerke, Marburg, Alemania) se ha mantenido mediante pasaje intraperitoneal en ratones hembra BALB / cAnN durante 30 años. Los parásitos se recogieron de la cavidad peritoneal de ratones infectados experimentalmente, en condicione estériles siguiendo procedimientos previamente descritos por Frago y colaboradores (1998). El ratón donador de parásitos, se sacrificó por dislocación cervical de acuerdo a la NOM-06-ZOO-1999, los cisticercos extraídos se colocaron en una caja de petri que contenía solución amortiguadora PBS, posteriormente, los metacestodos se lavaron 3 veces con la misma solución en un recipiente estéril para su selección.

#### **4.6. Viabilidad de cisticercos para cultivo**

La viabilidad de los cisticercos para la selección de parásitos se evaluó mediante dos formas. Una de ellas la tinción vital con azul tripano al 0,02%, segunda la motilidad inducida por temperatura durante 10 min a 40°C según lo reportado por Martínez-González y colaboradores en 2010.

#### **4.7. Método cuantitativo para medir la viabilidad del cisticerco de *T. crassiceps***

Inicialmente se realizaron ensayos para estandarizar las condiciones de manejo del parásito: tomando en cuenta el tamaño, parásitos menores o mayores a 4mm no se observa ningún efecto, así mismo se estandarizó el número de cisticercos empleados en cada ensayo. Posteriormente, se construyó una curva de concentración de citocromo *c* por cuadruplicado. El primer punto de la curva contenía 30 cisticercos vivos; el segundo punto 10 cisticercos muertos + 20 cisticercos vivos; el tercero 20 cisticercos muertos + 10 cisticercos vivos; y el último 30 cisticercos muertos. Todos los parásitos empleados en este ensayo se seleccionaron para que tuvieran un tamaño

homogéneo (4 mm). Los cisticercos considerados vivos se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) pH 7.0 y suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); la viabilidad fue verificada por la motilidad de los parásitos. Se obtuvieron cisticercos muertos (control) mediante tratamiento con Auranofin 10  $\mu$ M (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza) (Martínez-González *et al.*, 2015) durante 24 horas. Para cada punto de la curva, 30 cisticercos se colocaron en un tubo Eppendorf, se lavaron con PBS, después se eliminó el exceso de PBS con papel de filtro. Los cisticercos se homogeneizaron mecánicamente con un mortero en presencia de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 86  $\mu$ M (Sigma-Aldrich); el macerado se centrifugó a 17 300  $\times$ g durante 10 minutos, se recuperaron los sobrenadantes y se midió la DO a 280 nm (Proteínas) y 550 nm (citocromo *c*). Posteriormente, se calculó el cociente de 550/280 y se ajustó a la dilución.

#### **4.8. Activación de la vía clásica del complemento con anticuerpos anti-GK-1**

Los cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal de los ratones se seleccionaron para que tuvieran un tamaño homogéneo (4 mm) y se lavaron cinco veces en solución salina tamponada con fosfato estéril, pH 7.2 (PBS). Posteriormente, se cultivaron durante 48 horas en medio RPMI suplementado con penicilina-estreptomicina al 1%, junto con 100  $\mu$ g/ $\mu$ l de ac-anti-GK-1 y ac-control purificados, sin complemento o con 10  $\mu$ l de complemento de cobaya comercial (Rockland Immunochemicals, Pottstown, PA). Estas condiciones se estandarizaron previamente con curvas dosis-respuesta, tanto para el complemento como para los anticuerpos. Cada tratamiento incluyó 15 cisticercos y se realizó por cuadruplicado en tres experimentos independientes, para medir la viabilidad por los métodos que se mencionaran más adelante. Se incluyeron controles con cisticercos vivos y muertos. Después de 48 horas de cultivo, los cisticercos se procesaron como se menciona anteriormente, y el resultado del control de los cisticercos muertos se tomó como una

liberación de citocromo *c* al 100% para determinar el porcentaje de liberación para todos los tratamientos.

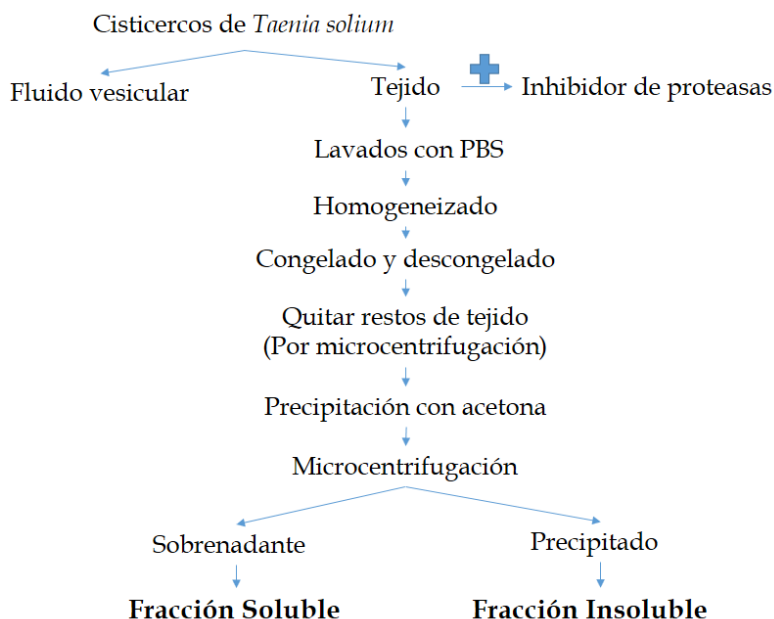
#### **4.9. Métodos para medir viabilidad de los cisticercos**

**Determinación de viabilidad por motilidad:** Pasadas las 48hs de cultivo de los parásitos, se observó cada una de las cajas de Petri con la ayuda de un microscopio estereoscópico para determinar el número de metacestodos vivos y muertos por motilidad.

**Determinación de viabilidad por colorantes vitales:** Terminado el tiempo del tratamiento, los parásitos fueron lavados 3 veces con 3ml de solución salina. Posteriormente fueron expuestos durante 10 minutos a una solución de azul tripano al 0.02% en solución salina y se observaron en el microscopio estereoscópico para determinar el número de vivos (no teñidos) y muertos (teñidos).

**Determinación de viabilidad por medición de citocromo *c*:** Después de haber medido viabilidad de los parásitos por motilidad, se recuperaron en un tubo eppendorf para medir citocromo *c* en el fluido vesicular como se describió anteriormente.

#### 4.10. Repertorio de proteínas reconocidas por el péptido GK1



Los metacestodos de *T. solium* se disecaron del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente criados en áreas rurales. Siete cisticercos se utilizaron para el extracto de proteína, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga y se lavaron varias veces en PBS estéril frío, pH 7.3; se mezcló con inhibidores de proteasa (EDTA 12,5 mM, pepstatina 1  $\mu$ M, PMSF 1 mM y leupeptina 0,1 mM). La pared del cisticerco se seccionó en una placa de Petri seca usando un bisturí para eliminar el fluido vesicular. Todos los pasos posteriores se realizaron a 4°C; el tejido se colocó en un tubo de microcentrífuga y se homogeneizó usando un pistilo de teflón en Tris 50 mM, pH 7.3 (1:2 p/v), con los mismos inhibidores de proteasa; posteriormente se homogeneizo en un vortex y se congeló-descongeló tres veces. Para descartar los restos de tejido, los extractos se centrifugaron inicialmente durante 1 minuto a 14000 xg y los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo durante 60 minutos a 14 000 x g. Después de la centrifugación, el sobrenadante (denominado en lo sucesivo fracción de proteína soluble) se precipitó durante la noche en acetona / TCA al 20% a -20°C, a continuación se centrifugó a 14000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se mezcló con acetona al 90% y luego se disolvió en urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4%. El precipitado (fracción de proteína insoluble) se lavó tres veces



con Tris 50 mM, pH 7.3, y se disolvió en un tampón que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, TBP 5 mM en Tris 10 mM, pH 7.3. La concentración de proteína en todas las fracciones se determinó usando el NI Protein Assay (G-Biosciences, St. Louis, MO).

#### **4.11. Electroforesis bidimensional de gel de poliacrilamida SDS (2D-PAGE)**

Se hizo una 2D-PAGE, 150 µg de cada fracción antigénica se diluyeron a en un volumen final de 70 µl (para fracciones insolubles) ó 120 µl (para fracciones solubles) en DTT 50 mM, azul de bromofenol y tampón IPG al 0,2% para un gradiente de pH 3-10 con el tampón apropiado. Estas mezclas se usaron para rehidratar durante la noche tiras de IPG no lineales de 7 cm, pH 3-10 (Bio-Rad, Hercules, CA) a 20°C. Todas las muestras se enfocaron en una célula Protean IEF (Bio-Rad). Las fracciones solubles se corrieron en un perfil de voltaje de cinco pasos: (i) aumento rápido de 0 a 250 V durante 30 minutos, (ii) 250 V durante 50 minutos, (iii) aumento rápido de 500 a 1000 V durante 30 minutos, (iv) 4000 V durante 120 min, y (v) 4000 V para 10 000 Vh, y una corriente máxima de 50 µA / banda. Se usó una secuencia diferente para las fracciones insolubles: (i) aumento rápido de 0 a 250 V durante 30 min, (ii) 500 V durante 50 min, (iii) aumento rápido de 500 a 1000 V durante 60 min, (iv) 4000 V durante 90 minutos, y (v) 4000 V para 10 000 Vh. Después de enfocar, las tiras se redujeron en tampón de equilibrado (urea 6 M, Tris 0,05 M pH 8.8, SDS 2% y glicerol 30%) que contenían DTT 2% durante 15 minutos y luego se alquilaron en el mismo tampón de equilibrado añadido con 2,5% de yodoacetamida por 15 min. Las muestras se sometieron a electroforesis (por duplicado) en geles prefabricados al 12% (Bio-Rad) usando una célula Mini Protean (Bio-Rad) a 200 V. Después de la electroforesis, los geles 2-D se fijaron durante la noche para tinción con plata o se transfirieron a una membrana PVDF.

#### **4.12. Tinción de proteínas**

Para la tinción con plata, se lavaron geles 2-DE fijos usando 100 ml de una solución acuosa de metanol al 5% y ácido acético al 1% (v/v) durante 15 minutos y luego en 100 ml de tiosulfato sódico al 0,02% durante 90 segundos, lavar tres veces con 100 ml

de agua desionizada MilliQ. Posteriormente, los geles se incubaron durante 40 min en nitrato de plata al 0,2% p/v en agua, se lavaron tres veces como se describe anteriormente, y se incubaron en 100 ml de una solución que contenía carbonato sódico al 6% (p /v), 50 µl de formaldehído 37%, y tiosulfato de sodio 25 µM. El desarrollo se detuvo con ácido acético al 7% v/v y agitación suave durante 5 minutos. Finalmente, los geles se lavaron tres veces en agua.

#### **4.13. Western blot**

Las fracciones de proteína soluble e insoluble de *T. solium* se resolvieron en 1D-PAGE y 2D-PAGE, y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante la noche a 4°C con 10% de leche descremada en PBS pH 7.3, se incubaron con una mezcla de cinco sueros de cerdos cisticercos infectados de forma natural (para 2D-PAGE el conjunto se diluyó 1:20 y para 1D-PAGE se diluyó 1: 100 en leche descremada al 10% en PBS), se lavaron tres veces con PBS 0.1% -Tween 20. Se utilizó una IgG policlonal anti-cerdo en conejo conjugada con peroxidasa (Sigma), como segundo anticuerpo, diluido 1: 500 en PBS 0.1% -Tween 20, visualizado la reacción con usando 4-cloro-1-naftol. Para determinar la presencia de IgG del huésped en las fracciones solubles e insolubles de cisticercos de *T. solium*, las membranas se bloquearon durante la noche, posteriormente se lavaron e incubaron con la IgG anti-cerdo conjugada con peroxidasa diluida.

#### **4.14. Estudio ultraestructural**

La microscopia se llevó a cabo en el departamento de patología de la FMVZ-UNAM. Para el estudio ultraestructural, se utilizaron metacestodos de *T. solium*. Los cisticercos se fijaron con glutaraldehído al 2,5% y formaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) durante 72 horas. Después de la fijación, los cisticercos se lavaron con tampón de cacodilato pH 7.2, las tres muestras se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas. Luego, se lavaron con tampón de cacodilato, se deshidrataron con concentraciones crecientes de acetona (JT Baker) hasta alcanzar el 100%, los metacestodos se dejaron incrustados en una mezcla

de resina epoxi (Epon 812, Electron Microscopy Sciences) y acetona durante 72 h. Luego, los cisticercos se incluyeron en cápsulas de gelatina con resina pura, se polimerizaron a 60°C durante 24 horas. Se obtuvieron secciones semi-finas de 150 µm en un ultramicrotomo y se montaron en portaobjetos de vidrio, en contraste con azul de toluidina (Electron Microscopy Sciences). Una vez que se identificó el área de interés, se obtuvieron secciones finas de 80 µm y se montaron en una pantalla de cobre, en contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo (Ciencias de Microscopía Electrónica), que se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1010 a 60 kV para detectar el daño por la activación del complemento.

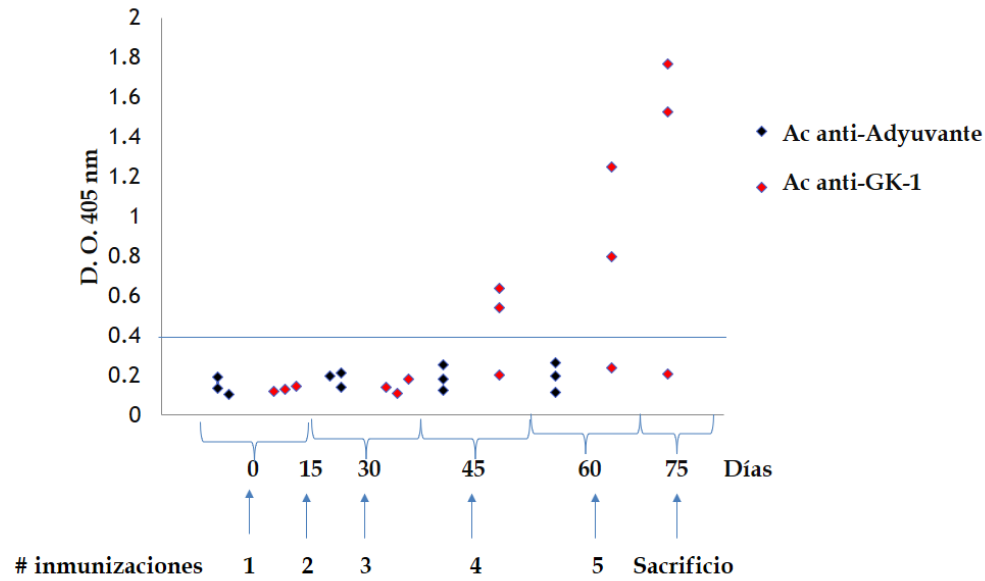
#### **4.15. Análisis estadístico**

Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk se usaron para determinar la normalidad de los resultados. Todos los resultados se distribuyeron normalmente, y se analizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey-Kramer (SPSS, IBM, Armonk, NY).

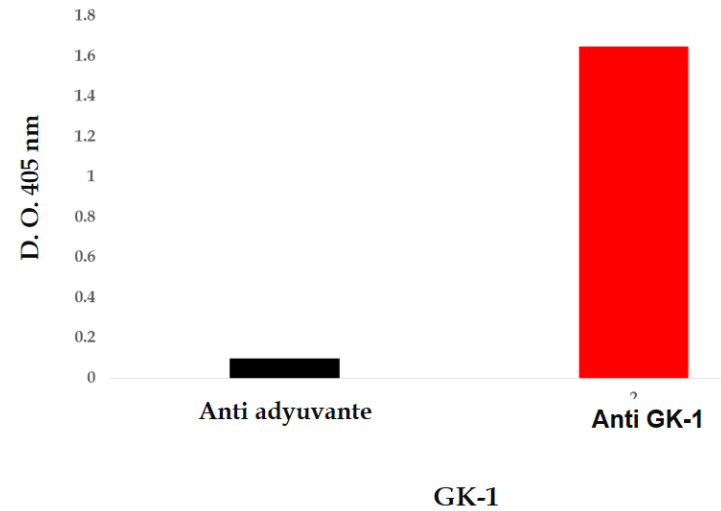
## 5. RESULTADOS

En la figura 9 se muestran las gráficas de las mediciones de los diferentes anticuerpos. En la figura 9A se observan las IgG totales en los cerdos inmunizados con el péptido GK-1 + adyuvante y los animales que solo recibieron adyuvante, en esta grafica se puede ver que los ac-anti-GK-1 comienzan aumentar a partir del tiempo 3 (30 días después de la primera inmunización), obteniéndose el pico a los 60 días. En la figura 9B se muestran los anticuerpos IgG1 anti GK-1 a los 60 días después de la primera inmunización (al momento de la necropsia). Se hizo una comparación entre los sueros control (adyuvante solo), suero de cerdos inmunizados con GK-1 más adyuvante y los anticuerpos purificados del pool de sueros de los dos cerdos inmunizados con GK-1 más adyuvante que presentaron mayores niveles de anticuerpos. Encontrándose lo esperado, una mayor densidad óptica en los sueros purificados. Se midieron anticuerpos IgM pero no se encontraron en ninguno de los tiempos.

### A. IgG Totales anti-GK-1



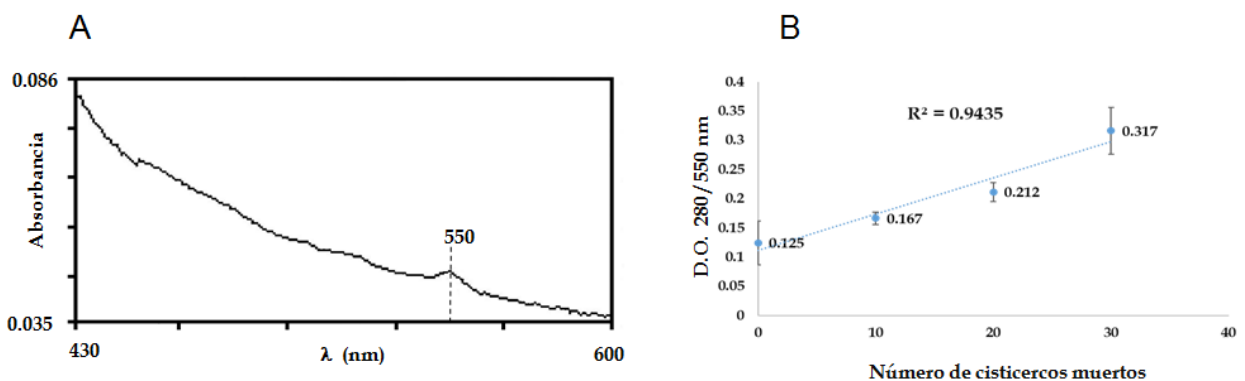
### B. IgG1 purificadas anti-GK-1



**Figura 9.-** Determinación de anticuerpos anti-GK-1 en sueros de cerdos por ELISA. A) Anticuerpos IgG totales en animales inmunizados con GK-1 más adyuvante (negro) y los cerdos que solo recibieron adyuvante (rojo). B) Anticuerpos IgG1 anti-GK-1 que fueron purificados en una columna de afinidad

### 5.1. Viabilidad del cisticerco de *T. crassiceps* mediante la evaluación de citocromo *c*

Se desarrolló un nuevo método cuantitativo basado en la medición de la concentración de citocromo *c* liberado cuando el parásito está dañado. La figura 10A muestra la señal a 550 nm en el espectro obtenido después de la reducción de la fracción de proteína soluble con ditionita, lo que indica la presencia de citocromo *c*. Una vez que el método fue estandarizado, se realizó un experimento por cuadruplicado para demostrar que los resultados eran consistentes. La figura 10B muestra los resultados de cuatro experimentos independientes realizados para construir una curva de liberación de citocromo *c* usando cuatro muestras, cada una de las cuales consta de 30 cisticercos de tamaño uniforme: 30 cisticercos vivos; 10 cisticercos muertos + 20 cisticercos vivos; 20 cisticercos muertos + 10 cisticercos vivos; o 30 cisticercos muertos. A medida que aumenta el número de cisticercos muertos, la liberación de citocromo *c* también aumenta, dando resultados medios de  $0.125 \pm 0.037$ ,  $0.167 \pm 0.011$ ,  $0.212 \pm 0.016$  y  $0.317 \pm 0.040$  respectivamente. Los cuatro experimentos arrojaron resultados muy similares, dando  $r^2 = 0.9435$ .



**Figura 10.** Validación de la medición de citocromo *c* como método cuantitativo. Se realizó una curva por cuatruplicado con cisticercos vivos y cisticercos muertos (tratados 24 hrs con 10  $\mu$ M Auranofin). La curva consistió en ir aumentando el número de cisticercos muertos (0 muertos + 30 vivos; 10 muertos + 20 vivos; 20 muertos + 10 vivos; y 30 muertos + 0 vivos). Una vez obtenidas las mediciones, se sacó el cociente 550/280 y se ajustó a la dilución. La viabilidad se verificó por motilidad.

## **5.2. Activación de la vía clásica del complemento con anticuerpos anti-GK-1**

Una vez que se desarrolló el método para evaluar el daño a los cisticercos, los cisticercos se cultivaron durante 48 horas con 100 µg de ac-anti-GK-1 y ac-control, sin complemento o con 10 µl de complemento de cobayo comercial, mostrándose los siguientes resultados en cuanto a la viabilidad del parásito según lo determinado por la exclusión del azul tripano, motilidad, la liberación de citocromo *c* y la microscopía electrónica.

## **5.3. Viabilidad determinada por la motilidad y la exclusión del azul tripano**

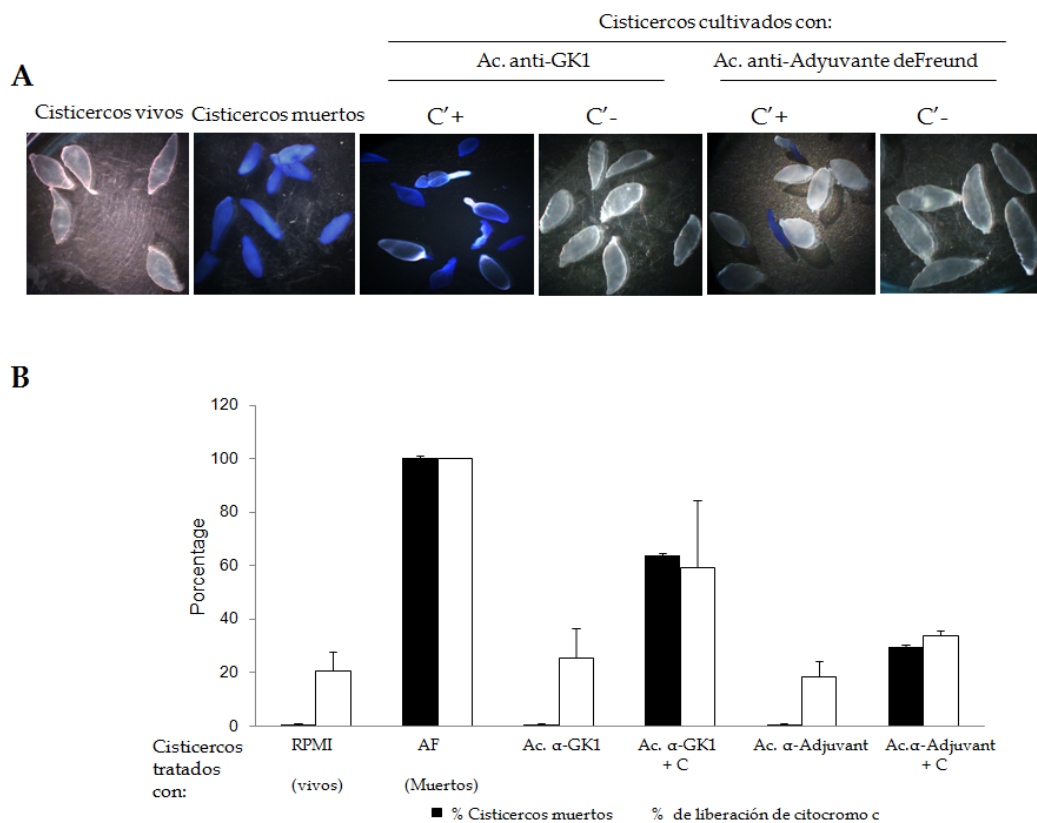
La tabla 3 muestra el número de cisticercos muertos debido a anticuerpos anti-GK-1 más complemento, medido por la motilidad y la exclusión del azul de tripano. Los cultivos que no contienen complemento tanto los ac-control como los ac-anti-Gk-1, no mostraron cisticercos muertos. Por otro lado, el tratamiento con ac-control más complemento causó la muerte de 53 de 180 parásitos (29.4%), mientras que los ac-anti-GK-1 más el complemento mataron a 115 de los 180 cisticercos (63.8), una diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.0001$ ). Como se muestra en la figura 11, la incubación de cisticercos con anticuerpos anti-GK-1 más complemento disminuye la exclusión del azul tripano.

**Tabla 3. Efecto de anticuerpos anti-GK-1 más complemento en la viabilidad de cisticercos de *T. crassiceps* medida por motilidad e incorporación de azul tripano.**

No. Experimento	Anticuerpos anti-GK-1		Anticuerpos anti-Adyuvante de Freund		P*
	Con Complemento*	Sin Complemento	Con Complemento*	Sin Complemento	
	Muertos/total (%)	Muertos/total (%)	Muertos/total (%)	Muertos/total (%)	
1	44/60 (73.3)†	0/60	14/60 (23.3)	0/60	0.0001
2	31/60 (51.6)	0/60	17/60 (28.3)	0/60	0.01
3	40/60 (66.6)	0/60	22/60 (36.7)	0/60	0.0001
Total	115/180 (63.9)	0/180	53/180 (29.4)	0/60	
Media ± DS.	38.3 ± 6.6	0	17.6±4.04	0	

Movilidad de los cisticercos a través del microscopio estereoscópico y aspecto de los cisticercos incubados 10 min. Azul tripano al 0.02%. † Relación de cisticercos muertos/número total de cisticercos (porcentaje). Vivos: no teñidos; muertos: teñidos. Las diferencias fueron establecidas por ANDEVA, posteriormente con la prueba de Tukey\* (P <0.05).





**Figura 11.** Viabilidad y relación del porcentaje de cisticercos muertos medida por azul tripano y citocromo *c*. Se recuperaron cisticercos de 4mm de *Taenia crassiceps* de la cavidad peritoneal. Se formaron 6 tratamientos que contenían 15 parásitos cada uno, los cuales fueron cultivados en medio RPMI con penicilina-estreptomomicina al 1%, con anticuerpos purificados anti-GK-1 y anti-Adyuvante a concentraciones de 100µg, sin complemento ó con 10µL de complemento de cobayo comercial. Pasadas 48 hrs del cultivo se expusieron con azul tripano 0.02% (A). Posteriormente se hizo una comparación entre los resultados del porcentaje de liberación del citocromo *c* y porcentaje de cisticercos muertos por azul tripano y motilidad. Mostrando una similitud entre los datos (B). Los cisticercos tratados con auranofil (AU) fueron el tratamiento control de muertos, por lo tanto la liberación de citocromo *c* dada por este tratamiento, se tomó como el 100% de la liberación del citocromo *c*.

#### **5.4. Viabilidad según lo determinado por la medición del citocromo *c***

Los resultados de la determinación del citocromo *c* mostraron la diferencia entre los cisticercos tratados con anticuerpos adyuvantes anti-GK-1 o anti-Freund solos y tratados con anticuerpo más complemento, con una tasa de cisticercos muertos de 48.7% y 35.6%, respectivamente (Tabla 4). Como se muestra en la Figura 11B, existe una estrecha relación entre el porcentaje de cisticercos muertos según lo determinado por la liberación de citocromo *c* y la exclusión del azul de tripano, que respalda los resultados de la estimación del daño. Encontramos una relación entre el daño a los cisticercos y la liberación de citocromo *c*, que permaneció lineal solo hasta un número de 30 cisticercos.

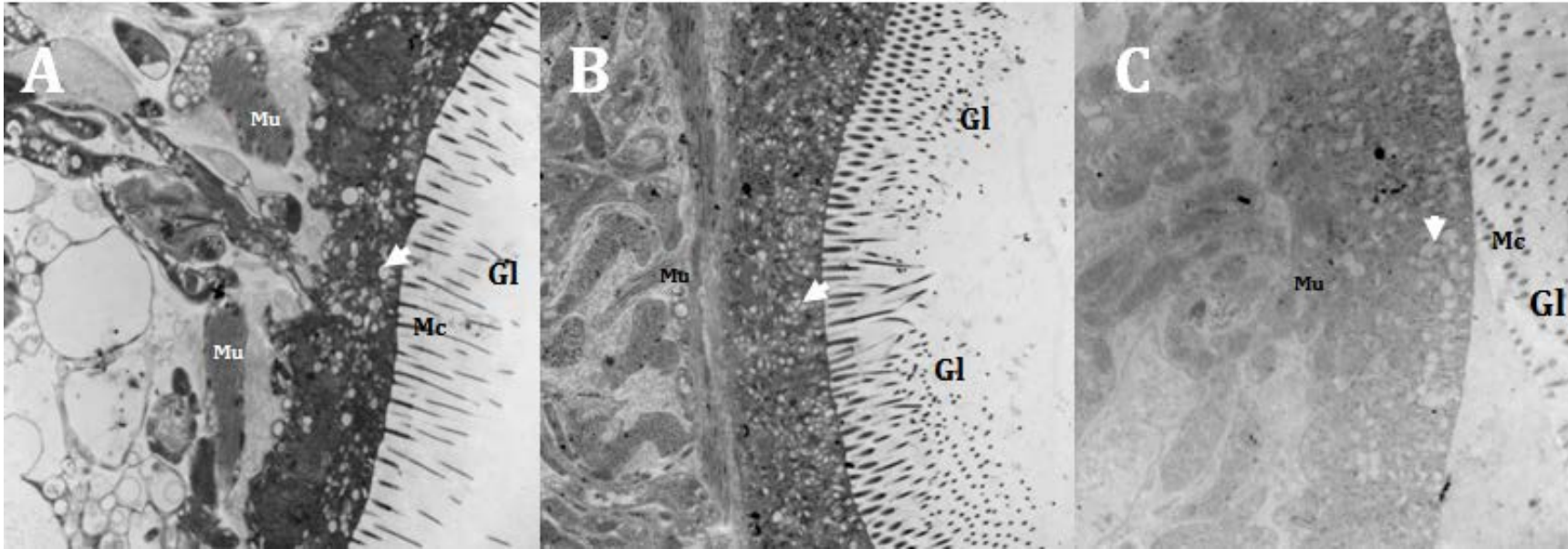
**Tabla 4. Estimación de la viabilidad de los cisticercos a través de la medición de liberación de citocromo *c***

No. Experimento	Control		Ac. anti-GK-1		Ac. anti- adyuvante de Freund		<i>P</i> *
	Muerto	Vivo	Con complemento	Sin complemento	Con complemento	Sin complemento	
1	100	15.37	55.48	20.25	37.87	14.09	0.0001
2	100	28.6	49.25	38.88	35.13	23.8	0.01
3	100	20.56	41.6	20.48	33.92	19.76	0.0001
Media ± DS	100	21.5 ± 6.6	48.7 ± 6.9	26.5 ± 10.6	35.6 ± 2.02	19.2 ± 4.8	

El porcentaje de liberación de citocromo *c* se midió en cisticercos tratados con 100µg de anticuerpos purificados anti-GK-1 y anti-Adyuvante, sin complemento ó con 10µL de complemento de cobayo comercial. Se utilizó un control de cisticercos vivos y uno de cisticercos muertos. A las 48hrs de cultivo se midió la liberación, tomando el citocromo *c* liberado en la muestra de control de cisticercos muertos como 100%, se calculó un valor porcentual para todos los tratamientos. Como se muestra en la tabla, a medida que aumenta el número de cisticercos muertos, también aumenta la concentración de citocromo *c* en el medio. Este experimento se repitió tres veces, cada una por duplicado. \* Las diferencias entre los diferentes tratamientos de los cisticercos se determinaron mediante ANOVA, seguido por la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 5.5. Evaluación ultraestructural

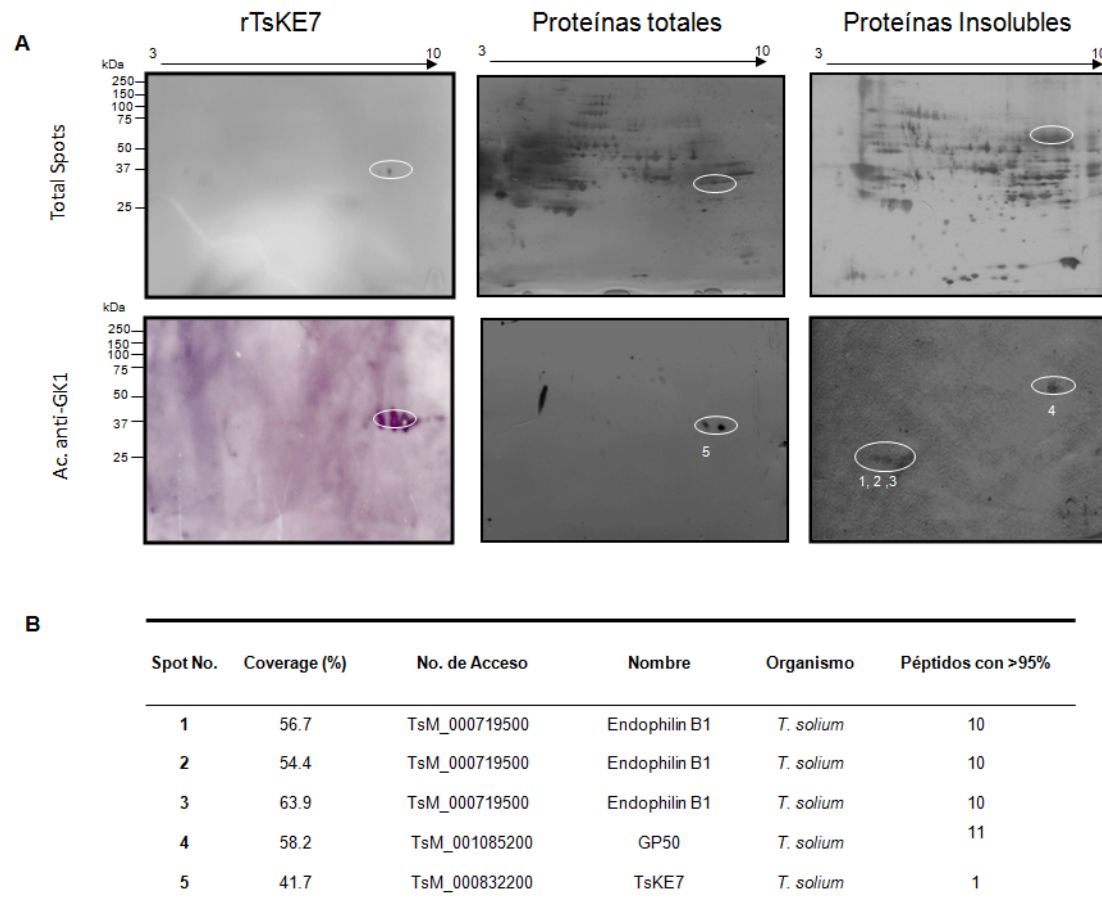
El daño inducido por anticuerpos anti-GK-1 más complemento sobre cisticercos se muestra en la figura 12. Los cambios ultraestructurales fueron: En los cisticercos no tratados (control) se observa una microtrica alargada, osmofílica en corte longitudinal, cuya superficie presenta estructuras multifocales, puntiformes, osmóticas (glicocalix). La cápsula muestra numerosas vacuolas electrolúcidas de diferentes diámetros, incluidas las mitocondrias y los desmosomas son escasos. Los músculos en corte longitudinal se pueden ver debajo de la cápsula. El efecto del complemento solo muestra microtricas electrodensa con diferente longitud; estructuras osmóticas puntiformes (compatibles con glicocalix) se pueden ver adyacentes a microtricas. La cápsula exhibe numerosas vacuolas electrolúcidas y homogéneas; los desmosomas electrodensos desagregados se sumergen en la cápsula, junto con las bandas musculares en corte longitudinal y transversal. En aquellos cisticercos tratados con anticuerpo anti-GK-1 más la adición de complemento de cobayo, se puede ver microtricas acortadas y desagregadas, e incluso separado de la cápsula; estructuras osmóticas en forma de punto (glicocalix) se pueden ver adyacentes a microtrica, en una cantidad menor que en la muestra de control. La cápsula exhibe numerosas vacuolas electrolúcidas, con diferentes grados de dilatación. Del mismo modo, los desmosomas están desagregados y con diferentes electrodensidades. Los músculos se pueden ver debajo de la cápsula, en corte longitudinal y transversal. Estos resultados indican que la muestra tratada con 100 µg de anticuerpo anti-GK-1 purificado más 10 µl de complemento comercial de cobaya mostró los cambios más significativos: microtrica acortada y desagregada, separada de la cápsula; reducción en glicocalix; y desmosomas desagregados con respecto a la muestra de control.



**Figura 12.** Microscopia electrónica de transmisión de cisticercos tratados con o sin complemento. **A.** Metacestodo tratado únicamente con medio RPMI (muestra control). Nótese las microtricas (Mc) electrodensas en corte longitudinal. El tegumento muestra numerosas vacuolas electrolúcidas de diferentes diámetros e inmersas hay grandes mitocondrias. **B.** Metacestodo tratado con complemento únicamente, obsérvese las microtricas (Mc) electrodensas con diferentes longitudes, adyacentes se aprecian estructuras puntiformes osmofílicas compatible con Glicocalix (Gl). El tegumento exhibe numerosas vacuolas electrolúcidas, músculo en corte longitudinal (Mu) y transversal. **C.** Metacestodo tratado con complemento comercial mas anticuerpos. Obsérvese las microtricas (Mc) electrodensas acortadas y desarregladas, adyacentes se aprecian estructuras puntiformes osmofílicas compatible con Glicocalix (Gl). El tegumento exhibe numerosas vacuolas electrolúcidas con grados variables de dilatación (flecha) músculo en corte longitudinal (Mu) y transversal. Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Barra= 2 m.

## **5.6. Repertorio de proteínas del cisticerco reconocidas por anticuerpos anti-GK-1**

El repertorio de antígenos de los cisticercos reconocidos por anticuerpos anti-GK-1 se evaluó mediante análisis proteómico. Como se esperaba, los anticuerpos anti-GK-1 reconocen fuertemente la proteína recombinante KETc7 (rTsKE7), que contiene la secuencia GK-1 (Figura 13A). Los anticuerpos anti-GK-1 también reconocieron proteínas adicionales en un extracto de proteína total y en la fracción insoluble de tejido del cisticerco. En el caso del extracto de proteína total, se reconocieron dos proteínas con el mismo peso molecular de KE7, lo que indica que los anticuerpos anti-GK-1 fueron capaces de reconocer la proteína KE7 en un extracto de proteína complejo. Además, también se reconocieron varias proteínas en el extracto total, así como en la fracción de proteína insoluble. Como se muestra en la figura 13A y B, los anticuerpos anti-GK-1 reconocieron dos proteínas parasitarias adicionales: endophilin B1 y GP50, esta última es una proteína del cisticerco altamente antigénica.



**Figura 13.** Caracterización inmuno-proteómica con anticuerpos anti-GK-1. (A) Mapas 2D-PAGE representativos de la proteína TsKE7 recombinante y extractos de proteínas totales e insolubles de cisticercos de *Taenia solium* obtenidos del músculo esquelético. Se empleó un anticuerpo anti-GK-1 de conejo para identificar la proteína TsKE7 en ambos extractos. (B) Se cortaron todas las manchas de proteína de un gel teñido con azul de Coomassie y se identificaron mediante espectrometría de masas en tándem. Los números de acceso se obtuvieron de la base de datos GeneDB (*Taenia solium*).

## 6. DISCUSIÓN

La vacuna S3Pvac, constituida por tres péptidos sintéticos denominados GK-1, KETc1 y KETc12, ha demostrado provocar altos niveles de protección contra la cisticercosis experimental murina, cunícula, y contra la cisticercosis porcina en cerdos expuestos a infecciones naturales (Toledo *et al.*, 1999; 2001; Huerta *et al.*, 2001; Betancourt *et al.*, 2012). La activación de la vía clásica del complemento se ha propuesto como el mecanismo de daño mediado por la vacuna, ya que la vacuna estimula la producción de anticuerpos específicos anti-GK-1. En estudios previos, se demostró que los anticuerpos anti-GK-1 son capaces de dañar los cisticercos de *T. solium*, inhibiendo su transformación en tenias en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (García *et al.*, 2001; Díaz-Orea *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismos por los cuales los anticuerpos dañan este parásito multicelular seguirán siendo desconocidos. Este estudio fue diseñado para evaluar si el daño del parásito está mediado por anticuerpos y complemento.

Un factor limitante al estudiar la eficacia de los tratamientos anti-cisticercosis es la falta de un método simple, sensible y cuantitativo para estimar el daño del cisticerco. Por lo que se propuso un nuevo método para estudiar la viabilidad del cisticerco, basado en la liberación de citocromo *c* asociado a la muerte del parásito. Este nuevo método nos permitió cuantificar la capacidad de los anticuerpos anti-GK-1 para mediar el daño del cisticerco mediante la activación de la vía clásica del complemento. El citocromo *c*, una homoproteína periférica de 13 kDa ubicada en la cara externa de la membrana interna de la mitocondria, tiene tres señales espectrofotométricas (427, 521 y 550 nm) (Poole, 1993). El citocromo *c* puede liberarse de las mitocondrias como consecuencia de una alteración en su morfología, como la producida por compuestos de oro como la aurotioglucosa, que causa una transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Ott *et al.*, 2002) o durante el aislamiento de mitocondrias (Del Arenal *et al.*, 2005) y, en general, por cambios en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (Karbowski *et al.*, 2004). El



citocromo *c* se considera una proteína proapoptótica que se libera durante los eventos tempranos de la apoptosis (Gogvadze *et al.*, 2006).

Curiosamente, la vacuna anti-GK-1 reconoce a la endofilina B1, una proteína que participa en la endocitosis y desencadena cambios en la curvatura de la membrana, modificando sus fosfolípidos (Karbowski *et al.*, 2004). La Endophilin B1 también es necesaria para mantener la morfología normal de las mitocondrias, y en Tenidos se informa que participa en el control de la dinámica membranar del tegumento (Ahn *et al.*, 2016). Endophilin B1 se encuentra en el citosol y se puede encontrar dentro de las mitocondrias en una forma transitoria, asociada con proteínas proapoptóticas de la familia Bax (Rostovtseva *et al.*, 2009).

Estas observaciones nos llevaron a considerar que, dado que el citocromo *c* puede liberarse de las mitocondrias con procedimientos simples y medirse espectrofotométricamente en solución, la concentración de citocromo *c* aumentaría en el medio que rodea a los cisticercos dañados por la vía clásica del complemento, donde la integridad de la membrana mitocondrial está comprometido. Este no sería el caso con los cisticercos vivos, donde las concentraciones de citocromo *c* en solución permanecerían bajas.

Primero se verificó con cisticercos vivos (cisticercos cultivados en medio solo) y cisticercos muertos (cisticercos cultivados en presencia de auranofil, un inhibidor de la tioredoxina glutatión reductasa, una enzima vital para cisticercos) la capacidad del ensayo para detectar daño cisticerco, obteniendo citocromo *c* concentraciones de 20.8% y 100%, respectivamente (datos no mostrados). Se realizaron experimentos adicionales donde el número de cisticercos muertos aumentó progresivamente: 30 cisticercos vivos; 10 cisticercos muertos + 20 cisticercos vivos; 20 cisticercos muertos + 10 cisticercos vivos; o 30 cisticercos muertos, lo que resulta en una relación lineal con  $r^2 = 0.9633$ . Para verificar aún más estos resultados, todas las mediciones se repitieron en tres experimentos independientes, obteniendo valores de  $r^2$  de 0.9075, 0.8165 y 0.9357. Promediando los cuatro resultados, se obtuvo un valor  $r^2$  de 0.9445. Estos resultados indican que la medición del citocromo *c* es reproducible. Los valores

de viabilidad son similares a los obtenidos por la motilidad y la exclusión del azul de tripano, lo que respalda la validez de los resultados aquí divulgados. Este nuevo método nos permitió cuantificar la capacidad de los anticuerpos anti-GK-1 para mediar el daño del cisticerco mediante la activación de la vía clásica del complemento.

Con respecto a los tratamientos en estudio, la muestra de cisticercos tratados con anticuerpos adyuvantes anti-Freund más complemento produjo 53 parásitos muertos de 180 (29.4%), mientras que la muestra tratada con anticuerpos anti-GK-1 más complemento produjo 115 parásitos muertos de 180 (63.8%), una diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.0001$ ). Ningún otro tratamiento produjo parásitos muertos (a excepción del control del cisticerco muerto). También se observó una diferencia en los niveles de citocromo *c* entre los cisticercos tratados con anticuerpos anti-GK-1 más el complemento y los tratados con anticuerpos adyuvantes anti-Freund más complemento, con un valor medio de 0,024 y 0,014, respectivamente.

Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-GK-1 más el complemento son capaces de dañar los cisticercos de *T. crassiceps* in vitro. Además, la especificidad de los anticuerpos anti-GK-1 inducidos merece algunos comentarios. Como era de esperar, los anticuerpos reconocieron la ubicua proteína KE7, distribuida en una familia de proteínas asociadas a procesos de membrana que pueden participar en varias vías celulares vitales. Por lo tanto, su reconocimiento puede dañar funciones cíclicas vitales. Los anticuerpos anti-GK-1 también reconocen la acil transferasa grasosa proapoptótica, endofilina B1. La unión de anticuerpos puede desencadenar la fijación del complemento, lo que da como resultado la liberación del citocromo *c* apoptótico. El bajo daño a los cisticercos mediados por anticuerpos de cerdos inyectados solo con el adyuvante completo de Freund podría deberse a una reactividad aumentada no específica de los anticuerpos inducidos.

En resumen, se proporciona aquí una clara evidencia de la relevancia de anticuerpos específicos en la destrucción de cisticercos mediada por el complemento inducida por la inmunización con GK-1.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Ahn C, Y, Bae S, Kim J, Kim J, Yu H, Yang K, Eom H, Wang I, Kang Y, Yang *et al.* (2016). Spatiotemporal expression patterns and antibody reactivity of Taeniidae endophilin B1. *Journal of Clinical Microbiology* 54: 2553-2562.
- Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernandez M, Sciutto E. (1996). Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol* 61(1-2): 49-59.
- Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernandez M, Zamora C, *et al.* (1999). *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet Parasitol* 81(2): 129-35.
- Aluja AS, Villalobos NM, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, Rodarte LF, Fragoso G, Sciutto E. (2005). Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine*. 23(31):4062-9.
- Assana E, Kyngdon CT, Gauci CG, Geerts S, Dorny P, De Deken R, Anderson GA, Zoli AP, Lightowers MW. (2010) Elimination of *Taenia solium* transmission to pigs in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon. *International Journal for Parasitology*. 40: 515-519.
- Baron PJ. (1968). On the histology and ultrastructure of *cysticercus longicollis*, the cysticercus of *Taenia crassiceps* Zeder, 1800, (Cestoda, Cyclophyllidae). *Parasitology* 58(3): 497-513.
- Berron PR, Penagos-Paniagua JM, Zaragoza-Benítez JM, Rodríguez-Alvarez J, Blancas-Galicia L. (2003). El sistema del complemento. Vías clásica y de la lectina que se une a manosa. *Alergia, Asma e Inmunol. Ped.* 12:46-52.
- Betancourt MA, De Aluja AS, Sciutto E, Hernández M, Bobes R J, Rosas G, Hernández B, Fragoso G, Hallal-Callerose C, Aguilar L, Flores-Peréz I. (2012). Effective protection induced by three different versions of the porcine S3Pvac anticysticercosis vaccine against rabbit experimental *Taenia pisiformis* cysticercosis. *Vaccine*. 30: 2760-2767.

- Bojail R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol 79(3):384-9
- Bonilla M, Rondón I. (2011). Biología comparada del sistema de complemento en peces. Rev CES Med Vet Zootec 6 (2): 74-90.
- Botero D, Castano S. (1982). Treatment of human cysticercosis with praziquantel in Colombia. Sal Pub Mex 4(6):91-9.
- Bundy DA. (1990). Control of intestinal nematode infections by chemotherapy: mass treatment versus diagnostic screening. Trans R Soc Trop Med Hyg 84(5): 622-5.
- Calderón J, Schreiber RD. (1985). Activation of the alternative and classical complement pathway by *Entamoeba histolytica*. Infection and immunity 50:560-565.
- Del Arenal P, Rubio MER, Ramirez J, Rendon JL, Escamilla E. (2005). Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing side-reaction of respiratory complex I with O<sub>2</sub>. Parasitology International 54: 185-193.
- Díaz-Orea MA, Mijares JM, Arcega R, Gómez-Conde E, Castellanos-Sánchez VO, Briones-Rojas R, Flores-Alonso JC, Marín-Briones MA, Santos-López G. (2013). In vitro effect of the S3Pvac vaccine against cysticercosis in human mononucleate cells. Revista Neurologia 56: 456-463.
- Díaz-Orea, M. (2004). Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular inducida por la inmunización de cerdos con tres péptidos sintéticos en contra de la cisticercosis por *Taenia solium*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de ciencias de la UNAM.
- Fleury A, Moreno J, Valdez P, Sayve M, Becerril P, Larralde C, Sciutto E. (2010). Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. PLoS Negl Trop Dis 4: e805
- Flisser A, Sarti E, Lightowlers M, Schantz P. (2003). Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. Acta Trop 87(1):43-51.

- Flisser A, Viniegra AE, Aguilar-Vega L, Garza-Rodríguez A, Maravilla P y Ávila G. (2004), "Portrait of Human Tapeworms", *Journal of Parasitology* 90(4):914-916.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Govezensky T, Sciutto E. (1996). Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol* 112:119-124.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Hernandez M, Sciutto E. (1998). Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 66:760-764.
- Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, Segura R, Goldbaum FA, Sciutto E, Rosas G. (2011). Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 18: 1067-1076.
- Freeman S. (1962). Studies of the biology of *Taenia crassices* (cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40, 969-990.
- Freeman RS, Fallis AM, Shea M, Maberly AL, Walters J. (1973). Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). Part II. The parasite. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 22:493-495.
- Garattini S, Goldin A, Hawking F, Kopin IJ. (1982). Hemoterapy of human intestinal helminthiases: A review, with particular reference to community treatment. *Adv Pharmacol/ Chem* 19: 128-154.
- Garcia G, Sciutto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, Flores I, Aluja A, V. José M, Larralde C. (2001). Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol* 87 (3):582-586.
- Giacomini RP, Gordon LD, Botto M, Mohamed RD, Sanderson DS, Taylor MS, Dent AL. (2008). The role of complement in innate, adaptative and eosinophil-dependent immunity to the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Molecular immunology* 45:446-455.

- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. (2006). Multiple pathways of cytochrome *c* release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica Biophysica Acta* 1757: 639-647.
- Hamelmann C, forester B, Burchard GD, Shetty N, Horstmann RD. (1993). Induction of complement resistance in cloned pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Parasite immunology* 15: 223-228.
- Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M. (2001). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20: 262-266.
- Karbowski M, Jeong S, Youle RJ. (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biology* 166: 1027-1039.
- Keilbach NM, de Aluja AS, Sarti E. (1989). A programme to control taeniasis-cysticercosis (*Taenia solium*) experiences in a Mexican village. *Acta Leiden* 57:181-189.
- Laclette, JP, Ornelas MT, Merchant y Willms K. (1982), "Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs", en Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C y Beltrán F. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, Nueva York, pp. 375-388.
- Larralde C. y Aluja AS *Cisticercosis: Guía para profesionales de la Salud*. Fondo de Cultura Económica. México. 2006: 41-86.
- Larralde C, Montoya R, Sciutto E, Díaz M, Govezensky T, Coltorti E. (1989). Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg* 40 (3): 282-90.
- Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC. (1995). Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Molec Bio* 52: 575-580.
- Lezama AP. (2007). Importancia del Sistema del complemento. *Rev. Med. Vallejana* 4:68-78

- Lidani KCF, Sandri TL, Andrade FA, Bavia L, Nisihara R, Messias-Reason IJ. (2018). Complement Factor H as a potential atherogenic marker in chronic Chagas' disease. *Parasite Immunol.* 40(7):e12537.
- Lightowers MW. (1989). Recent advances in vaccination against cysticercosis. *Acta Leidensia* 57: 135-142.
- Manoutcharian K, Larralde C, Aluja A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Villalobos N, Rodarte L, Govezensky T, Baca M, Sciutto E. (1995). Advances in the Development of a Recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vaccine* 95: 63-68.
- Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E. (1996). Cysticercosis identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology* 82: 250-254.
- Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Álvarez G, Rendón-Gómez JL, del Arenal IP. (2010). In vitro killing action of auranofin on *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR) *Parasitology Research* 107: 227-231.
- Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Rendón JL, del Arenal IP. (2015). Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 201: 16-25.
- Molinari JL, Tato P, Sepúlveda J, Carabez A. (1986). Ultrastructure evidence for damage of *Taenia solium* cysticerci from naturally parasitized, immunized hogs. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 28: 47-61.
- Morales J, Martínez JJ, Rosetti M, Fleury A, Maza V, Hernandez M, Villalobos N, Fragoso G, de Aluja AS, Larralde C, *et al.* (2008). Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2: e284.
- Moska, B. (1999). *Trichinella spiralis*: In vitro cytotoxicity of peritoneal cells against synchronous newborn larvae of different age. *Parasitology research.*85:59-63
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.



- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. (2002). Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1259-1263.
- Poole RK. (1993). Analysis of cytochromes In: Goodfellow M, O'Donnell AG editors. *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester. John Wiley and Sons Ltd, 311-344.
- Rodriguez-Contreras D, Skelly PJ, Landa A, Shoemaker CB, Laclette JP. (1998). Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology*. 117 (Pt 6):579-88.
- Rostovtseva TK, Boukari H, Antignani A, Shiu B, Banerjee S, Neutzner A, Youle RJ. (2009). Bax activates endophilin B1 oligomerization and lipid membrane vesiculation. *Journal of Biological Chemistry* 284: 34390-34399.
- Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M, Wijeyaratne P. (1997). Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 56(2): 127-3.
- Sarti E, Rajshekhar V. (2003). Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Trop* 87(1): 137-43.
- Sciutto E, Fragoso G, Díaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res* 77:343-346.
- Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, Cervantes J, Aluja A, Larralde C. (2013). Development of the S3Pvac vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis: a historical review. *Journal of Parasitology* 99: 686-692.
- Sciutto E, Martínez JJ, Villalobos N, Hernández M, José MV, Beltrán C, Rodarte F, Flores I, Bobadilla JR, Fragoso G, Parkhouse ME, Harrison LJ, de Aluja AS. (1998). Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Veterinary Parasitology* 79: 299-313.

- Segura R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. (2009). Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK-1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 16:1338-1343.
- Silverman PH. 1954. Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia*. I. Factors affecting hatching and activation of Taeniid ova, and some criteria of their viability. *Agricultural Research Council April*:207-215.
- Smyth AD, McManus DP. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Cambridge, UK:5-21.
- Terrazas LL, Bojalil R, Rodriguez-Sosa M, Govezensky T, Larralde C. (1999). *Taenia Crassiceps* cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility. *Parasitol Res* 85(12): 1025-31.
- Toenjes SA, Spolski RD, Mooney KA, Kuhn RE. (1999). The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed TH1/TH2-type response. *Parasitol* 118(6):623-633.
- Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, López-Casillas F. (2001). Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 69: 1766- 1773.
- Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M. (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 67: 2522- 2530.
- Valdez F, Hernandez M, Govezensky T, Fragoso G and Sciutto E. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80(6):931-936.
- Van Beek AE, Sarr I, Correa S, Nwakanma D, Brouwer MC, Wouters D, Secka F, Anderson STB, Conway DJ, Walther M, Levin M, Kuijpers TW, Cunningham AJ. (2018). Complement factor levels associate with *Plasmodium falciparum* malaria susceptibility and severity. *Open Forum Infect Dis.* 20; 5(7):166.

- Whiteman LY, Marciano-Cabral F. (1987). Susceptibility of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria spp.* to complement-mediated lysis. *Infection and immunity*. 55:2442-2447.
- Whiteman LY, and Marciano-Cabral F. (1989). Resistance of highly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae to complement-mediated lysis. *Infection Immunity* 57:3869-3875.
- William PE. *Fundamental Immunology*. 3<sup>rd</sup> edición; Raven Press. Ltd., New York 1993
- Willms K, Caro JA, Robert L. (2003a). Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitology Research* 90, 479–488.
- Willms K, Robert L, Caro JA. (2003b). Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. *Parasitology Research* 89:308-316.
- Willms K, and Zurabian R. (2010). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology* 137(3):335-46.

## 8. ÍNDICE DE FIGURAS


Figura 1. Escólex de <i>Taenia solium</i>	4
Figura 2. Estructura de la <i>Taenia solium</i>	5
Figura 3. Corte histológico del metacestodo de <i>Taenia solium</i>	7
Figura 4. Microscopia electrónica del metacestodo de <i>Taenia crassiceps</i>	8
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	10
Figura 6. Ciclo de vida silvestre de <i>T. crassiceps</i>	11
Figura 7. Estructura del péptido GK-1	17
Figura 8. Esquema de las vías de activación del complemento	21
Figura 9. Mediciones de anticuerpos	33
Figura 10. Validación de la medición de citocromo <i>c</i> como método cuantitativo	34
Figura 11. Viabilidad y relación del porcentaje de muertos medida por azul tripano y citocromo <i>c</i> .	37
Figura 12. Microscopia electrónica de cisticercos tratados con o sin complemento	41
Figura 13. Caracterización inmuno-proteómica de anticuerpos anti-GK-1	43

## 9. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vacunas contra la cisticercosis por <i>Taenia solium</i>	14
Tabla 2. Citotoxicidad dependiente del complemento	18
Tabla 3. Efecto de anticuerpos anti-GK-1 más complemento en la viabilidad de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> medida por motilidad e incorporación de azul tripano.	36
Tabla 4. Estimación de la viabilidad de cisticercos a través de la medición de citocromo <i>c</i>	39



# Anti-GK1 antibodies damage *Taenia crassiceps* cysticerci through complement activation

Guadalupe Núñez<sup>1</sup> · Nelly Villalobos<sup>1</sup> · Cinthia P. Herrera<sup>1</sup> · José Navarrete-Perea<sup>2</sup> · Adriana Méndez<sup>1</sup> · José J. Martínez-Maya<sup>1</sup> · Raúl J. Bobes<sup>2</sup> · Gladis Fragoso<sup>2</sup> · Edda Sciutto<sup>2</sup>  · Laura Aguilar<sup>3</sup> · Irene P. del Arenal<sup>3</sup>

Received: 8 March 2018 / Accepted: 23 May 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Taeniasis-cysticercosis, a zoonosis caused by *Taenia solium*, is prevalent in underdeveloped countries, where marginalization promotes its continued transmission. Pig cysticercosis, an essential stage for transmission, is preventable by vaccination. An efficient multi-epitope vaccine against pig cysticercosis, S3Pvac, was developed. Previous studies showed that antibodies against one of the S3Pvac components, GK-1, are capable of damaging *T. solium* cysticerci, inhibiting their ability to transform into the adult stage in golden hamster gut. This study is aimed to evaluate one of the mechanisms that could mediate anti-GK-1 antibody-dependent protection. To this end, pig anti-GK-1 antibodies were produced and purified by using protein A. Proteomic analysis showed that the induced antibodies recognized the respective native cysticercal protein KE7 (Bobes et al. Infect Immun 85:e00395-17, 2017) and two additional *T. solium* proteins (endophilin B1 and Gp50). A new procedure to evaluate cysticercus viability, based on quantifying the cytochrome *c* released after parasite damage, was developed. *Taenia crassiceps* cysticerci were cultured in the presence of differing amounts of anti-GK-1 antibody and complement in a saturating concentration, along with the respective controls. Cysticercus viability was assessed by recording parasite motility, trypan blue exclusion, and cytochrome *c* levels in cysticercal soluble extract. Anti-GK-1 antibody significantly increased cysticercus damage as measured by all three methods. Parasite evaluation by electron microscopy after treatment with anti-GK-1 antibody plus complement demonstrated cysticercus damage as shorter, capsule-severed microtrichia; a decrease in glycocalyx length with respect to untreated cysts; and disaggregated desmosomes. These results demonstrate that anti-GK-1 antibodies damage cysticerci through classic complement activation.

**Keywords** GK-1 · Complement system · *Taenia crassiceps* cysticerci · Cyst viability · Cytochrome *c*

---

Section editor: Sabine Specht

---

- ✉ Edda Sciutto  
edda@unam.mx
- ✉ Irene P. del Arenal  
darenal@bq.unam.mx

- <sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico
- <sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico
- <sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City, Mexico

## Introduction

Taeniasis-cysticercosis is a zoonosis caused by *Taenia solium*, endemic in underdeveloped countries. When cysticerci are located in the human central nervous system, they cause neurocysticercosis, the most severe form of the infection. While cysticercosis is deemed as eradicable, it is frequently reported in most countries in Latin America, Asia, and Africa, where large sectors of the population still suffer high levels of social marginalization. A similar situation occurs in Mexico: the frequency of the disease between 1994 and 2004 did not decrease, according to data from the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, a tertiary referral center serving neurological patients from across the country (Fleury et al. 2012).

Porcine cysticercosis, also caused by *T. solium*, is susceptible to damage by the immunity induced by the infection itself. When experimentally challenged with parasite eggs,

well-nourished pigs kept in clean and stress-free facilities can destroy most of the cysts established in skeletal muscle within 1 year (Aluja et al. 1996, 1999). Indeed, cysticerci are even more susceptible to the immunity induced by vaccination, as shown by Molinari et al. (1986), Lightowers (1989), and Sciutto et al. (2013), where various parasite antigens, originally derived from *T. solium* or related cestodes (*T. crassiceps*, *T. saginata*, *T. ovis*) in different developmental stages (i.e. oncospheres, cysticerci), of recombinant or synthetic origin, have proved to reduce the infection rate and parasite load in vaccinated pigs challenged with *T. solium* eggs under experimental conditions. The protective capacity of three vaccine candidates, i.e., S3Pvac-synthetic, S3Pvac-phage, and TSOL18 under natural conditions of transmission (Huerta et al. 2001; Morales et al. 2008; Assana et al. 2010), has also been reported. The S3Pvac vaccine is composed by three peptides first identified in *T. crassiceps*, named as GK-1, KETc1, and KETc12. GK-1, an 18-amino acid peptide, induced high protection levels against experimental murine cysticercosis, both coupled and uncoupled to the core matrix of multiple antigen peptides, or glutaraldehyde-linked to bovine serum albumin (Huerta et al. 2001). Noticeably, the highest protection levels in mice (89–94%) were induced by synthetic GK-1 in its uncoupled form (Toledo et al. 2001). While several vaccine candidates have been reported as successful and their antiparasite immunity has been assessed, much of their action mechanisms remain obscure or unexplored. The immunity elicited by parenteral or oral GK-1 administration was studied in a murine model (Toledo et al. 1999; Fragoso et al. 2011). These works showed that GK-1 induces an exacerbated humoral and cellular response. Additionally, anti-GK-1 antibodies are able of damaging *T. solium* cysticerci, inhibiting its development as proved in a taeniasis experimental model in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) (García et al. 2001).

It has been demonstrated that antibodies can mediate damage to different parasite species through the classical complement activation pathway or by cytotoxicity (Calderón and Schreiber 1985; Whiteman and Marciano-Cabral 1987). Antibodies can mediate damage to parasites by the following: (i) classical complement activation (Giacomin et al. 2008); (ii) by other effector functions of antibodies, e.g., ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) by NK cells via the Fc receptor (Mourglia-Ettlin et al. 2016; Attallah Lewis et al. 1980); (iii) Fc receptors could also mediate parasite destruction by eosinophil and basophil degranulation, and these can release a mix of pro-inflammatory substances that affect parasite viability (i.e., peroxidase, histamine, proteoglycans, serotonin, serine proteases, etc.); and (iv) Fc receptors can also mediate macrophage and neutrophil activation; once activated, both cells of the innate immune response can produce free radicals that may alter parasite homeostasis (Calderón and Schreiber 1985; Whiteman and Marciano-Cabral 1987; Giacomin et al. 2008; Whiteman and Marciano-Cabral 1989; Hamelmann et al.

1993). However, the mechanisms mediating damage to cysticerci by anti-GK-1 antibodies remain unknown.

A limiting factor in the study of damage to cysticerci is the lack of a simple, sensitive, and precise test to quantify it. A new procedure to study cysticercus viability, based on cytochrome *c* release associated to parasite death, is herein described. This new procedure allowed us to quantify the capacity of anti-GK-1 antibodies to mediate damage to cysticerci through the complement activation classic pathway. One of the mechanisms mediating the capacity of anti-GK-1 antibodies to damage the parasite was identified herein in *T. crassiceps* cysticerci, which share the expression of GK-1 with other cestodes (Rassy et al. 2010).

## Material and methods

### Synthetic peptide (GK-1)

The linear GK-1 peptide (Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ser Asp Pro Asn Thr Phe Tyr Ala Pro Pro Tyr Ser Ala) corresponds to the amino acids 69–85 of the KETc7 recombinant antigen from *T. crassiceps* (Manoutcharian et al., 1996) plus a terminal Ala from the resin. The peptide was synthesized by the multiple peptide solid-phase technique as described elsewhere (Gevorkian et al. 1996). The synthetic peptide was at least 95% pure as proved by reverse-phase high-performance liquid chromatography.

### Pigs and immunization

Six York-Landrace, 3-month-old, cysticercosis-free, female pigs were purchased in the farm of the National University of Mexico (UNAM) in Jilotepec, State of Mexico, and transferred to Mexico City to be kept in the farm of the UNAM Veterinary School in controlled sanitary conditions to prevent infections.

Three piglets were s.c. administered six times with 250 µg of GK-1 plus incomplete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich) in the base of the ear every 2 weeks. The other three piglets were s.c. administered with the adjuvant alone, in a similar schedule. Complete Freund adjuvant was employed only in the first immunization. Four-milliliter whole blood samples were taken from the external jugular vein from all immunized pigs by intravenous puncture before immunization and at different days (0, 15, 30, 45, 60) post-immunization to evaluate the level of antibodies elicited of the pigs 1 day before each immunization. The S-Monovette blood collection system (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) was used, equipped with a 1.5-in. yellow needle. After clotting, blood samples were centrifuged (DESAGA Sarstedt-Gruppe, Zentrifuge L-12) at 25000×g for 20 min at 40 °C. Serum was recovered and stored at –20 °C until processed.

## Antibody detection by ELISA

Serum antibody levels were determined by indirect ELISA, using *T. solium* cyst fluid as antigen source, following a previously described procedure with minor modifications (Sciutto et al. 1998). After incubation with 100  $\mu$ l of *T. solium* cyst fluid (1  $\mu$ g/ml) in borate-buffered saline (BBS), pH 9.6, for 60 min at 37 °C, the wells were washed and incubated with 100  $\mu$ l of pig serum diluted 1:100 in PBS-Tween for 60 min at 37 °C. Antibodies were detected with 100  $\mu$ l of rabbit alkaline phosphatase anti-pig IgG (whole molecule) conjugate (Sigma), diluted to the optimum concentration (1:1000), and followed by substrate (para-nitrophenylphosphate, Sigma, 5 mg/ml). The color reaction was stopped using 50  $\mu$ l/well of NaOH 2 N, and absorbance values were measured at 405 nm in an ELISA reader (Human GMBH, Humareader Model 2106, Wiesbaden, Germany). A serum sample was regarded as positive when optical density (OD) reading exceeded the 99% confidence interval (mean value of control (non-immunized) + 3 standard deviations).

## Antibody purification

Antibodies were purified with the Pierce Protein A IgG Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA), following the manufacturer's directions.

## *Taenia crassiceps* cysticerci

*Taenia crassiceps* ORF strain, isolated by Freeman (1962) and supplied by B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany), has been maintained by serial i.p. passage in BALB/cAnN female mice for 30 years. Parasites were harvested from the peritoneal cavity of experimentally infected mice following procedures previously described (Fragoso et al. 1998).

## Development and validation of a quantitative method to measure *T. crassiceps* cysticerci viability

Initial assays were performed to standardize parasite handling conditions. Then, a cytochrome *c* concentration curve was constructed in quadruplicate. To determine each point on the curve, cysts of uniform size were included in four samples, each containing a different number of living and dead cysticerci: 30 living cysts (point 0); 10 dead cysts + 20 living cysts (point 10); 20 dead cysts + 10 living cysts (point 20); and 30 dead cysts (point 30). Living cysticerci were kept in RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) pH 7.0 supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and viability was verified by motility. Dead cysticerci (control) were obtained by treatment with Auranofin 10  $\mu$ M (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) (Martínez-González et al. 2015) for 24 h. For

each curve point, the combinations of living and dead cysts described above were placed in an Eppendorf tube and washed with PBS, removing the excess of PBS with filter paper. Cysts were mechanically homogenized with a pestle in the presence of phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 86  $\mu$ M (Sigma-Aldrich); samples were centrifuged at 14,500 $\times$ g for 10 min, supernatants were recovered, and volume and OD were measured at 280 and 550 nm after adding 1.2 mg of sodium dithionite. Then, the 550/280 (reduced cyt *c*/protein) quotient was calculated and adjusted to dilution.

## Activation of the complement classical pathway with anti-GK-1 antibodies

Cysticerci recovered from the peritoneal cavity of mice were selected to be homogeneous in size (4 mm) and washed five times in sterile phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS). Then, cysts were cultured for 48 h in RPMI medium supplemented with 1% penicillin-streptomycin, along with 100  $\mu$ g of purified anti-GK-1 and anti-Freund adjuvant antibodies, either without complement or with 10  $\mu$ l of commercial guinea pig complement (Rockland Immunochemicals, Pottstown, PA). These conditions were previously standardized with different antibody-complement curves. Each treatment included 15 cysts and was performed in quadruplicate in three independent experiments to measure viability either by the cytochrome *c* quantitative technique or by trypan blue exclusion in the other two boxes. Controls with living and dead cysts, as described above, were included. After 48 h of culture, cysticerci were processed as mentioned above, and the reduced cytochrome *c* concentration/protein in the dead-cysts control was taken as 100% cytochrome *c* release, to determine release percent for all treatments.

## Cysticercus viability

Cysticercus viability was assessed either by vital staining (0.02% trypan blue) and temperature-induced motility (10 min 40 °C) as previously reported (Martínez-González et al. 2010), or by cytochrome *c* detection, as described above.

## Soluble and insoluble fractions of cysticerci

*Taenia solium* metacestodes were dissected from the skeletal muscle of naturally infected pigs reared in rural areas. Cysticerci were washed five times in sterile ice-cold PBS, pH 7.3, and the bladder wall was sectioned in a dry Petri dish using a scalpel to eliminate vesicular fluid. All subsequent steps were performed at 4 °C, unless otherwise is specified. Cysticerci were transferred to a microcentrifuge tube and washed several times in PBS added with a mixture of protease inhibitors (EDTA 12.5 mM, pepstatin 1  $\mu$ M, PMSF 1 mM, and leupeptin 0.1 mM). Seven cysticerci were used for each

protein extract; the tissue was placed into a microcentrifuge tube and homogenized using a Teflon pestle in (1:2 w/v) Tris 50 mM pH 7.3, with the same protease inhibitors; then vortexed and freeze-thawed three times. To discard tissue debris, the extracts were centrifuged initially for 1 min at 14,000×g and the supernatants were centrifuged again for 60 min at 14,000×g. After centrifugation, this supernatant (hereafter called soluble protein fraction) was precipitated overnight in acetone/TCA 20% at -20 °C, then centrifuged at 14,000×g for 15 min at room temperature, and the precipitate was washed twice with acetone 90% and then dissolved in urea 7 M, thiourea 2 M, and CHAPS 4%. The precipitate (insoluble protein fraction) was washed three times with Tris 50 mM, pH 7.3, and dissolved in a buffer containing urea 7 M, thiourea 2 M, TBP 5 mM in Tris 10 mM, pH 7.3, added with various detergents. Protein concentration in all fractions was determined using the NI Protein Assay (G-Biosciences, St. Louis, MO).

### Two-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis

In the case of 2D-PAGE, 150 µg of each antigenic fraction was diluted to a final volume of 70 µl (for insoluble fractions) or 120 µl (for soluble fractions) in DTT 50 mM, bromophenol blue, and IPG buffer 0.2% for a 3–10 pH gradient with the appropriate buffer. These mixtures were used to rehydrate overnight 7-cm non-linear IPG strips, pH 3–10 (Bio-Rad, Hercules, CA) at 20 °C. All samples were focused in a Protean IEF Cell (Bio-Rad). Soluble fractions were run in a five-step voltage profile: (i) fast increase from 0 to 250 V for 30 min, (ii) 250 V for 50 min, (iii) fast increase from 500 to 1000 V for 30 min, (iv) 4000 V for 120 min, and (v) 4000 V for 10,000 Vh, and a maximum current of 50 µA/strip. A different sequence was used for insoluble fractions: (i) fast increase from 0 to 250 V for 30 min, (ii) 500 V for 50 min, (iii) fast increase from 500 to 1000 V for 60 min, (iv) 4000 V for 90 min, and (v) 4000 V for 10,000 Vh. After focusing, the strips were reduced in equilibration buffer (urea 6 M, Tris 0.05 M pH 8.8, SDS 2%, and glycerol 30%) containing DTT 2% for 15 min and then alkylated in the same equilibration buffer added with 2.5% iodoacetamide for 15 min. The samples were electrophoresed (in duplicate) in 12% Precast gels (Bio-Rad) using a Mini Protean cell (Bio-Rad) at 200 V. After electrophoresis, the 2D gels were fixed overnight for silver staining or transferred onto a PVDF.

### Protein staining

For silver staining, fixed 2-DE gels were washed using 100 ml of an aqueous solution of methanol 5% and acetic acid 1% (v/v) for 15 min and then in 100 ml of sodium thiosulfate 0.02% for 90 s, and washed three times with 100 ml of MilliQ

deionized water. Afterwards, the gels were incubated for 40 min in silver nitrate 0.2% w/v in water, washed three times as described above, and incubated in 100 ml of a developing solution containing sodium carbonate 6% (w/v), 50 µl formaldehyde 37%, and sodium thiosulfate 25 µM. Development was stopped with acetic acid 7% v/v and gentle shaking for 5 min. Finally, the gels were washed three times in water.

### Immunoblotting

Soluble and insoluble protein fractions were resolved in 1D-PAGE and 2D-PAGE, and then transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad). The membranes were blocked overnight at 4 °C with 10% skim milk in PBS pH 7.3, incubated with a pool of five naturally infected cysticercotic pig sera (for 2D-PAGE, the pool was diluted 1:20, and for 1D-PAGE, it was diluted 1:100 in 10% skim milk in PBS), and washed three times with PBS 0.1%-Tween 20. A polyclonal rabbit anti-pig IgG, conjugated with peroxidase (Sigma), was used as second antibody, diluted 1:500 in PBS 0.1%-Tween 20, and visualized using 4-chloro-1-naphthol. To determine the presence of host IgG and haptoglobin in the insoluble and soluble fractions of *T. solium* cysts, the membranes were blocked overnight as above, and then washed and incubated with the anti-pig IgG conjugated with peroxidase diluted as described above. Likewise, to determine the presence of host haptoglobin in the cyst extracts, a sheep anti-human haptoglobin diluted 1:300 was used as primary antibody and a rabbit anti-sheep IgG conjugated to peroxidase, diluted 1:1000 in the same buffer, as secondary antibody.

### Electron microscopy

Three samples of *T. solium* metacestodes, marked as 1, 2, and 3, were used for the ultrastructural study. Cysts were fixed with glutaraldehyde 2.5% and formaldehyde 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) for 72 h. After fixation, cysts were washed with cacodylate buffer pH 7.2, and the three samples were post-fixed with osmium tetroxide 1% for 2 h. Then, the samples were washed with cacodylate buffer and dehydrated with increasing acetone concentrations (JT Baker) until reaching 100%, and metacestodes were left embedded in an epoxy resin mixture (Epon 812, Electron Microscopy Sciences) and acetone for 72 h. Then, cysts were included in gelatin capsules with pure resin and polymerized at 60 °C for 24 h. Semi-fine, 150-µm sections were obtained in a ultramicrotome and mounted on glass slides, contrasted with toluidine blue (Electron Microscopy Sciences). Once the area of interest was identified, fine, 80-µm sections were obtained and mounted on a copper screen, contrasted with uranyl acetate and lead citrate (Electron Microscopy Sciences), to be observed in a Jeol 1010 electron microscope at 60 kV.



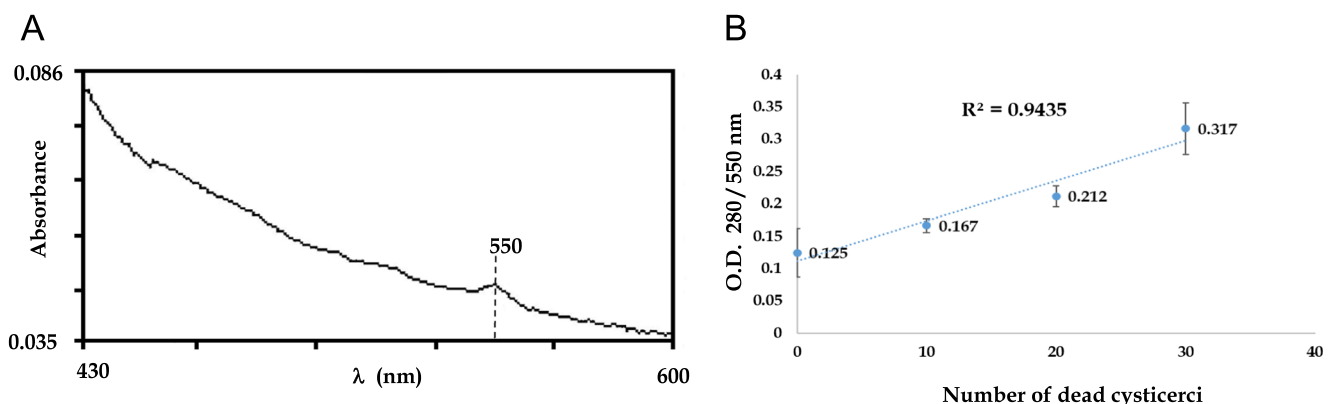
## Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests were used to determine the normality of the results. All results were normally distributed and were analyzed by ANOVA and the Tukey-Kramer test (SPSS, IBM, Armonk, NY).

## Results

### Development and validation of a quantitative method to measure *T. crassiceps* cysticerci viability

A new quantitative method was developed based on measuring the concentration of cytochrome *c* released when the parasite is damaged. Figure 1a shows the signal at 550 nm in spectra obtained after reduction of the soluble protein fraction with dithionite, indicating the presence of cytochrome *c*. Once the method was standardized, an experiment was conducted in quadruplicate to demonstrate that results are consistent. Figure 1b shows the results of four independent experiments performed to construct a curve of cytochrome *c* release using four samples, each consisting of 30 cysts of uniform size: 30 living cysts; 10 dead cysts + 20 living cysts; 20 dead cysts + 10 living cysts; or 30 dead cysts. As the number of dead cysts increases, cytochrome *c* release increases as well, giving mean results of  $0.125 \pm 0.037$ ,  $0.167 \pm 0.011$ ,  $0.212 \pm 0.016$ , and  $0.317 \pm 0.040$ . The four experiments yielded very similar results, giving  $r^2 = 0.9435$ . While this value for determination coefficient is not ideal, it is very close to 1, and the variability inherent to any biological indicator should be considered when discussing it.



**Fig. 1** Validation of cytochrome *c* measuring as a quantitative method. **A** A curve was constructed in quadruplicate with samples containing living and/or dead cysticerci (treated with Auranofin 10  $\mu$ M for 24 h). The points on the curve were determined by increasing the number of dead cysts (0 dead cysts + 30 living cysts; 10 dead cysts + 20 living cysts; 20 dead cysts + 10 living cysts; or 30 dead cysts + 0 living cysts). Optical density (OD) at 280 and 550 nm was measured in the extract obtained as

### Activation of the complement classical pathway with anti-GK-1 antibodies

Once the method to evaluate damage to cysticerci was developed, cysts were cultured for 48 h with 100  $\mu$ g of purified anti-GK-1 and anti-Freund adjuvant antibodies, either without complement or with 10  $\mu$ l of commercial guinea pig complement.

The following results show the parasite viability as determined by trypan blue exclusion and motility, cytochrome *c* release, and electron microscopy.

### Viability determined by motility and trypan blue exclusion

Table 1 shows the number of dead cysts due to anti-GK-1 antibodies plus complement, as measured by motility and trypan blue exclusion. The cultures containing purified antibodies only, either anti-GK-1 or anti-Freund adjuvant, failed to show dead cysts. On the other hand, treatment with anti-Freund adjuvant plus complement caused the death of 53 out of 180 parasites (29.4%), while anti-GK-1 antibodies plus complement killed 115 out of 180 cysts (63.8), a statistically significant difference ( $P = 0.0001$ ). As shown in Fig. 2a, incubating cysticerci with anti-GK-1 antibodies plus complement decreases trypan blue exclusion.

### Viability as determined by cytochrome *c* measurement

The results of cytochrome *c* determination showed the difference between cysticerci treated with anti-GK-1 or anti-Freund adjuvant antibodies alone and treated with antibody plus complement, with a rate of dead cysts of 48.7 and 35.6%, respectively (Table 2). As shown in Fig. 2b, there is a close relationship between the percentage of dead cysticerci as determined by cytochrome *c* release and trypan blue exclusion, which

described in the “Material and methods” section; the 550/280 quotient was calculated, and the result was adjusted to dilution. Viability was verified by motility. **a** Difference spectra (reduced minus oxidized) of the soluble protein fraction obtained as described in “Materials and methods”. **b** Standard curve of OD 250/550 ratio vs. number of dead cysts. Cytochrome *c* reduction was induced by adding sodium dithionite (1.2 mg)

**Table 1** Effect of anti-GK-1 antibodies plus complement on the viability of *Taenia crassiceps* cysticerci, determined by motility and trypan blue exclusion

Experiment No.	Anti-GK-1 antibodies		Anti-Freund adjuvant antibodies		P*
	Complement*	No complement	Complement*	No complement	
1	44/60 (73.3) <sup>a</sup>	0/60	14/60 (23.3)	0/60	0.0001
2	31/60 (51.6)	0/60	17/60 (28.3)	0/60	0.01
3	40/60 (66.6)	0/60	22/60 (36.7)	0/60	0.0001
Total	115/180 (63.9)	0/180	53/180 (29.4)	0/60	
Mean ± SD	38.3 ± 6.6	0	17.6 ± 4.04	0	

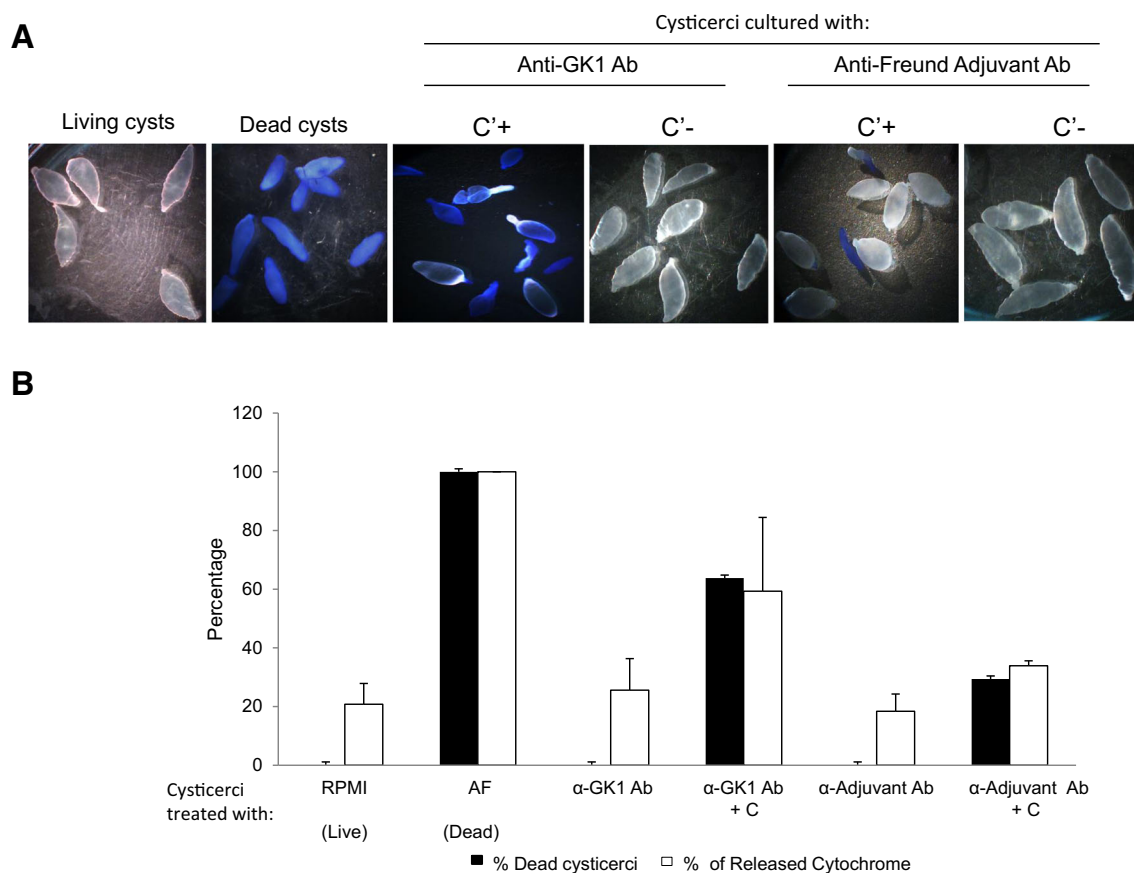
Mobility of cysticerci through stereoscopic microscope, and appearance of cysts incubated for 10 min. Trypan blue 0.02%

<sup>a</sup> Relation of dead cysticerci/total number of cysticerci (percentage). Living: not stained; dead: stained. Differences were determined by ANOVA, and then with Tukey's test (\* $P < 0.05$ )

supports the damage estimation results. We found a relationship between damage to cysticerci and cytochrome *c* release, which remained linear only up to a number of cysticerci.

**Transmission electron microscopy** The damage induced by anti-GK1 antibodies plus complement over cysticerci is

shown in Fig. 2. Each sample exhibited several ultrastructural changes, individually described below (Fig. 3). In non-treated cysticerci (control), the sample shows elongated, osmophilic microtrichia in longitudinal cut, whose surface exhibits multifocal, point-shaped, osmophilic structures (glycocalyx). The capsule shows numerous electrolucent vacuoles of different



**Fig. 2 a** Cysticercus viability determined by exclusion of trypan blue staining. Cysts recovered from the peritoneal cavity of mice are selected for size homogeneity (4 mm). In each treatment, 15 parasites were cultured in RPMI medium plus 1% penicillin-streptomycin, with 100 μg of anti-GK-1 and anti-Freund adjuvant antibodies, either without complement or with 100 μl of commercial guinea pig complement or with AF (10 μM) as a positive dead cyst control. After

48 h of culture, cysts were exposed to 0.02% trypan blue. **b** Relationship of dead cyst percent rate between viability as measured by trypan blue exclusion and cytochrome *c* determination. The fraction of released cytochrome *c* and the percentage of dead cysts as determined by trypan blue exclusion and motility were compared, and the similitude between both results is shown

**Table 2** Estimation of cysticerci viability through cytochrome *c* measurement (% of released cytochrome *c*<sup>a</sup>)

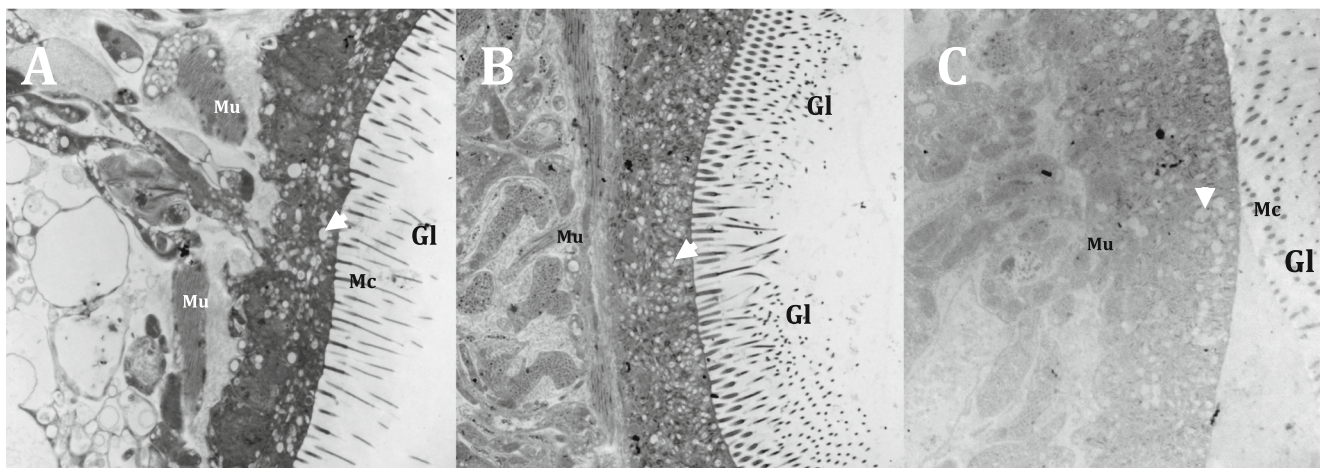
Experiment No.	Control		Anti-GK-1 Ab		Anti-Freund adjuvant Ab		<i>P</i> *
	Dead	Living	Complement	No complement	Complement	No complement	
1	100	15.37	55.48	20.25	37.87	14.09	0.0001
2	100	28.6	49.25	38.88	35.13	23.8	0.01
3	100	20.56	41.6	20.48	33.92	19.76	0.0001
Mean ± SD	100	21.5 ± 6.6	48.7 ± 6.9	26.5 ± 10.6	35.6 ± 2.02	19.2 ± 4.8	

Cysticerci were treated with 100 µg of purified anti-GK-1 and anti-Freund adjuvant antibodies, either without complement or with 10 µL of commercial guinea pig complement. A living-cyst control and a dead-cyst control were used. After 48 h of culture, cysts were washed with PBS, removing excess PBS with filter paper. Cysticerci were mechanically homogenized with a pestle in the presence of PMSF 86 µM and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. Supernatants were recovered and OD was measured at 280 and 550 nm; the 550/280 quotient was calculated, and the result was adjusted to dilution

<sup>a</sup> Taking the cytochrome *c* released in the dead-cyst control sample as 100%, a percent value was calculated for all treatments. As shown in the table, as the number of dead cyst increases, cytochrome *c* concentration in the medium also increases. This experiment was repeated three times, each in duplicate. \*Differences between cysticerci treated with Anti-GK1 Ab plus complement and with anti-Freund Adjuvant plus complement were determined by ANOVA, followed by Tukey's test \*(*P* < 0.05)

diameters, including mitochondria and scarce desmosomes. Muscles in longitudinal cut can be seen under the capsule. The effect of complement alone shows electrodense microtrichia with differing length; point-shaped, osmophilic structures (compatible with glycocalyx) can be seen adjacent to microtrichia. The capsule exhibits numerous electro-lucid, homogeneous vacuoles; disaggregated electro-dense desmosomes are immersed in the capsule, along with muscle bands in longitudinal and transversal cut. In those cysticerci treated with purified anti-GK-1 antibody with guinea pig

complement, microtrichia can be seen shortened and disaggregated, and even severed from the capsule; point-shaped, osmophilic structures (glycocalyx) can be seen adjacent to microtrichia, in smaller amount than in the control sample. The capsule exhibits numerous electro-lucid vacuoles, with differing degrees of dilation. Similarly, desmosomes are disaggregated and with differing electro-densities. Muscles can be seen under the capsule, in longitudinal and transversal cut. These results indicate that the sample treated with 100 µg of purified anti-GK-1 antibody plus 10 µl of commercial guinea



**Fig. 3** **a** Transmission electron micrograph. Metacystode cultured in RPMI medium alone (control sample). Note the electro-dense microtrichia in longitudinal cut. The capsule exhibits numerous electro-lucid vacuoles of varying diameters, and large mitochondria included. Muscle in longitudinal cut (Mu). Contrast technique with uranyl acetate and lead citrate. Bar = 2 µm. **b** Transmission electron micrograph depicting a metacystode treated with 10 µl of commercial guinea pig complement. Note the electro-dense microtrichia with differing lengths; adjacent are point-shaped, osmophilic structures (compatible with glycocalyx). The capsule exhibits numerous

electro-lucid vacuoles, and muscle in longitudinal (Mu) and transversal cut. Contrast technique with uranyl acetate and lead citrate. Bar = 2 µm. **c** Transmission electron micrograph depicting a metacystode treated with 100 µg of purified anti-GK-1 antibody plus 100 µl of commercial guinea pig complement. Note the shortened, disaggregated, electro-dense microtrichia; adjacent are point-shaped osmophilic structures (compatible with glycocalyx). The capsule exhibits numerous electro-lucid vacuoles with varying degrees of dilation (arrow), and muscle in longitudinal (Mu) and transversal cut. Contrast technique with uranyl acetate and lead citrate. Bar = 2 µm

pig complement showed the most significant changes: shortened and disaggregated microtrichia, severed from the capsule; reduction in glycocalyx; and disaggregated desmosomes with respect to the control sample.

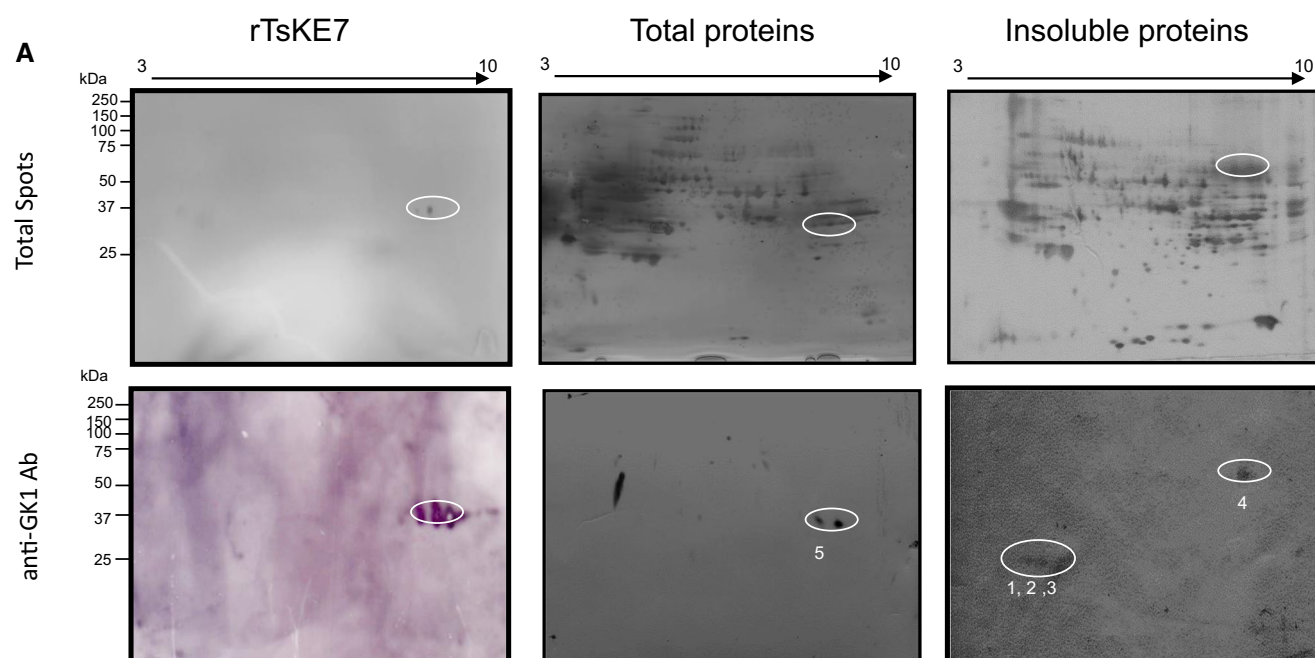
### Repertoire of cysticercal proteins recognized by anti-GK-1 antibodies

The repertoire of cysticercal antigens recognized by anti-GK1 antibodies was evaluated by proteomic analysis. As expected, anti-GK-1 antibodies strongly recognized the recombinant KE7 protein (rTsKE7), which contains the GK-1 sequence (Fig. 4a). Anti-GK-1 antibodies also recognized additional protein spots in a total protein extract and in the insoluble protein fraction of cyst tissue. In the case of total protein extract, two protein spots with the same molecular weight and PI of

KE7 were recognized, indicating that anti-GK1 antibodies were able to recognize the KE7 protein in a complex protein extract. In addition, several protein spots were also recognized in the total extract, as well as in the insoluble protein fraction. As shown in Fig. 4a, b, anti-GK-1 antibodies recognized two additional parasite proteins: endophilin B1 and GP50, the latter reported as a highly antigenic cysticercal protein.

### Discussion

The S3Pvac vaccine, constituted by three synthetic peptides named GK-1, KE7c1, and KE7c12, has demonstrated to elicit high protection levels against murine and rabbit experimental cysticercosis, and against swine cysticercosis in pigs exposed to natural challenge (Toledo et al. 1999, 2001; Huerta et al.



Spot No.	Coverage (%)	Accession no.	Name	Organism	Peptides with >95%
1	56.7	TsM_000719500	Endophilin B1	<i>T. solium</i>	10
2	54.4	TsM_000719500	Endophilin B1	<i>T. solium</i>	10
3	63.9	TsM_000719500	Endophilin B1	<i>T. solium</i>	10
4	58.2	TsM_001085200	GP50	<i>T. solium</i>	11
5	41.7	TsM_000832200	TsKE7	<i>T. solium</i>	1

**Fig. 4** Immunoproteomic characterization of anti-GK1 antibodies. **a** Representative 2D-PAGE maps of the recombinant TsKE7 protein and total and insoluble protein extracts of *Taenia solium* cysts obtained from skeletal muscle. A rabbit anti-GK1 antibody was employed to identify the

TsKE7 protein in both extracts. **b** All protein spots were cut from a Coomassie blue-stained gel and identified by tandem mass spectrometry. Accession numbers were obtained from the GeneDB database (*Taenia solium*)

2001; Betancourt et al. 2012). Activation of the complement classical pathway has been proposed as the vaccine-mediated mechanism of damage, since the vaccine stimulates the production of anti-GK-1-specific antibodies. In previous studies, it was demonstrated that anti-GK-1 antibodies are capable of damaging *T. solium* cysticerci, inhibiting their transformation into tapeworms in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) (García et al., 2001; Díaz-Orea et al. 2013). However, the mechanisms by which antibodies damage this large multicellular parasite remain unknown. This study was designed to evaluate if the damage of the parasite is mediated by antibodies and complement.

A limiting factor when studying the efficacy of anti-cysticercosis treatments is the lack of a simple, sensitive, and quantitative method to estimate cyst damage. A new method to study cyst viability, based on cytochrome *c* release associated to parasite death, is herein proposed. This new method allowed us to quantify the capacity of anti-GK-1 antibodies to mediate cyst damage by activating the complement classical pathway.

Cytochrome *c*, a 13-kDa, peripheral haemprotein located in the outer face of mitochondria inner membrane, has three spectrophotometric signals (427, 521, and 550 nm) (Poole 1994). Cytochrome *c* can be released from the mitochondria as a consequence of an alteration in its morphology such as that produced by gold compounds such as the aurothioglucose, which causes a mitochondrial membrane permeability transition (Ott et al. 2002), or during mitochondria isolation (del Arenal et al. 2005) and in general by changes in the permeability of the mitochondrial outer membrane (Karbowski et al. 2004). Cytochrome *c* is considered as a pro-apoptotic protein that is released during the early events of apoptosis (Gogvadze et al. 2006). In this study, the spectrophotometric method of cytochrome *c* determination was previously standardized, demonstrating that there is a difference in the release of cytochrome *c* between viable *T. crassiceps* cysts and dead (Auranofin-inactivated) cysts. Thus, the percent ratio of cytochrome *c* released by live cysts with respect to total protein content after homogenization is a baseline that can be deducted from the total cytochrome *c* concentration, giving a quantitative measure of cyst viability.

Interestingly, the anti-GK1 vaccine recognized endophilin B1, a protein that participates in endocytosis and triggers changes in membrane curvature, modifying its phospholipids (Karbowski et al. 2004). Endophilin B1 is also required to maintain the normal morphology of mitochondria, and in Taeniids, it is reported to participate in controlling tegument membranal dynamics (Ahn et al. 2016). Endophilin B1 is located in the cytosol and can be found within the mitochondria in a transient form, associated with proapoptotic proteins of the Bax family (Rostovtseva et al. 2009).

These observations led us to consider that, since cytochrome *c* can be released from mitochondria with simple procedures and can be spectrophotometrically measured in

solution, cytochrome *c* concentration would be increased in the medium surrounding those cysticerci damaged by the complement classical pathway, where mitochondrial membrane integrity is compromised. This would not be the case with living cysts, where cytochrome *c* concentrations in solution would remain low.

We first verified with living cysts (cysticerci cultured in medium alone) and dead cysts (cysts cultured in presence of auranofin, an inhibitor of thioredoxin glutathione reductase, a vital enzyme for cysticerci) the capacity of the assay to detect cysticercal damage, obtaining cytochrome *c* concentrations of 20.8 and 100%, respectively (data not shown). Additional experiments were performed where the number of dead cysts increased progressively: 30 living cysts; 10 dead cysts + 20 living cysts; 20 dead cysts + 10 living cysts; or 30 dead cysts, resulting in a linear relationship with  $r^2 = 0.9633$ . To further verify these results, all measurements were repeated in three independent experiments, obtaining  $r^2$  values of 0.9075, 0.8165, and 0.9357. Averaging all four results, an  $r^2$  value of 0.9445 was obtained. These results indicate that cytochrome *c* measurement is reproducible. Viability values are similar to those obtained by motility and trypan blue exclusion, which supports the validity of the results herein reported. This new method allowed us to quantify the capacity of anti-GK-1 antibodies to mediate cyst damage by activating the complement classical pathway.

With respect to the treatments under study, the sample of cysticerci treated with anti-Freund adjuvant antibodies plus complement yielded 53 dead parasites out of 180 (29.4%), while the sample treated with anti-GK-1 antibodies plus complement yielded 115 dead parasites out of 180 (63.8%), a statistically significant difference ( $P = 0.0001$ ). No other treatment yielded dead parasites (except for the dead cyst control). A difference in cytochrome *c* levels was also observed between cysticerci treated with anti-GK-1 antibodies plus complement and those treated with anti-Freund adjuvant antibodies plus complement, with a mean value of 0.024 and 0.014, respectively.

These results demonstrate that anti-GK-1 antibodies plus complement are capable of damaging *T. crassiceps* cysticerci in vitro. Furthermore, the specificity of the anti-GK-1 antibodies induced merits some comments. As expected, antibodies recognized the ubiquitous KE7 protein, distributed in a family of proteins associated to membrane processes that may participate in several vital cell pathways (Bobes et al. 2017). Thus, its recognition may damage vital cysticercal functions. Anti-GK-1 antibodies also recognized the proapoptotic fatty acyl transferase, endophilin B1. Antibody binding may trigger complement fixation, resulting in the release of the apoptotic cytochrome *c*. The low damage to cysts mediated by antibodies from pigs injected only with Freund's complete adjuvant could be due to some non-specific increased reactivity of the antibodies induced.

In summary, clear evidence of the relevance of specific antibodies in complement-mediated cysticercal destruction induced by GK-1 immunization is herein provided.

**Acknowledgements** This study was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (grant numbers IG200414, IN218816), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 253891), Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank Juan Francisco Rodríguez for copyediting this manuscript and Marisela Hernandez for technical support. All authors have read and approved the final draft.

**Funding** This study was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (grant numbers IG200414, IN218816), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 253891), Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the CICUAE of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- Ahn C, Bae Y, Kim S et al (2016) Spatiotemporal expression patterns and antibody reactivity of Taeniidae endophilin B1. *J Clin Microbiol* 54: 2553–2562
- Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A et al (1996) Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol* 61:49–59
- Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernandez M, Zamora C, Sciuotto E (1999) *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet Parasitol* 81:129–135
- Assana E, Kyngdon CT, Gaudi CG, Geerts S, Dorny P, de Deken R, Anderson GA, Zoli AP, Lightowers MW (2010) Elimination of *Taenia solium* transmission to pigs in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon. *Int J Parasitol* 40:515–519
- Attallah Lewis FA, Urritia-Shaw A, Folks T, Yeatman TJ (1980) Natural killer cells (NK) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 63:351–354
- Betancourt MA, De Aluja AS, Sciuotto E, Hernández M et al (2012) Effective protection induced by three different versions of the porcine S3Pvacant cysticercosis vaccine against rabbit experimental *Taenia pisiformis* cysticercosis. *Vaccine* 30:2760–2767
- Bobes RJ, Navarrete-Perea J, Ochoa-Leyva A, Anaya VH, Hernández M, Cervantes-Torres J, Estrada K, Sánchez-López F, Soberón X, Rosas G, Nunes CM, García-Varela M, Sotelo-Mundo RR, López-Zavala AA, Gevorkian G, Acero G, Lacleste JP, Fragoso G, Sciuotto E (2017) Experimental and theoretical approaches to investigate the immunogenicity of *Taenia solium*-derived KE7 antigen. *Infect Immun* 85:e00395-17
- Calderón J, Schreiber RD (1985) Activation of the alternative and classical complement pathway by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 50:560–565
- Del Arenal IPM, Rubio ER, Ramirez J, Rendon JL, Escamilla E (2005) Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacystode (cysticerci) is explained by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing side-reaction of respiratory complex I with O<sub>2</sub>. *Parasitol Int* 54:185–193
- Díaz-Orea MA, Mijares JM, Arcega R, Gómez-Conde E, Castellanos-Sánchez VO, Briones-Rojas R, Flores-Alonso JC, Marín-Briones MÁ, Santos-López G (2013) In vitro effect of the S3Pvac vaccine against cysticercosis in human mononucleate cells. *Rev Neurol* 56: 456–463
- Fleury A, Sciuotto E, Larralde C (2012) Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Publica Mex* 54:632–636
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernandez M, Sciuotto E (1998) Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 66:760–764
- Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA (2011) Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clin Vaccine Immunol* 18:1067–1076
- Freeman S (1962) Studies of the biology of *Taenia crassiceps* (cestoda). *Can J Zool* 40:969–990
- García G, Sciuotto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C et al (2001) Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol* 87:582–586
- Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciuotto F (1996) Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett* 49:185–189
- Giacomin RP, Gordon LD, Botto M, Mohamed RD et al (2008) The role of complement in innate, adaptive and eosinophil-dependent immunity to the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol Immunol* 45: 446–455
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2006) Multiple pathways of cytochrome *c* release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757:639–647
- Hamelmann C, Forester B, Burchard GD, Shetty N, Horstmann RD (1993) Induction of complement resistance in cloned pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 15:223–228
- Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M, Gevorkian G, Acero G, Díaz A, Alvarez I, Avila R, Beltrán C, García G, Martínez JJ, Larralde C, Sciuotto E (2001) Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20:262–266
- Karbowski M, Jeong S, Youle RJ (2004) Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 166:1027–1039
- Lightowers MW (1989) Recent advances in vaccination against cysticercosis. *Acta Leiden* 57:135–142
- Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G et al (1996) Cysticercosis identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 82:250–254
- Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Rendón JL, del Arenal IP (2015) Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Mol Biochem Parasitol* 201:16–25
- Molinari JL, Tato P, Sepúlveda J, Carabez A (1986) Ultrastructure evidence for damage of *Taenia solium* cysticerci from naturally parasitized, immunized hogs. *Rev Latinoam Microbiol* 28:47–61
- Morales J, Martínez JJ, Rosetti M, Fleury A, Maza V, Hernandez M, Villalobos N, Fragoso G, de Aluja AS, Larralde C, Sciuotto E (2008) Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e284

- Mourglia-Ettlin G, Merlino A, Capurro R, Dematteis S (2016) Susceptibility and resistance to *Echinococcus granulosus* infection: associations between mouse strains and early peritoneal immune responses. *Immunobiology* 221:418–426
- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1259–1263
- Poole RK (1994) Analysis of cytochromes. In: Goodfellow M, O'Donnell AG (eds) *Chemical methods in prokaryotic systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, pp 311–344
- Rassy D, Bobes RJ, Rosas G, Anaya VH, Brehm K, Hernández B, Cervantes J, Pedraza S, Morales J, Villalobos N, de Aluja AS, Lacleste JP, Nunes CM, Biondi GF, Fragoso G, Hernández M, Sciutto E (2010) Characterization of S3Pvac anti-cysticercosis vaccine components: implications for the development of an anti-cestodiasis vaccine. *PLoS One* 5:e11287
- Rostovtseva TK, Boukari H, Antignani A, Shiu B, Banerjee S, Neutzner A, Youle RJ (2009) Bax activates endophilin B1 oligomerization and lipid membrane vesiculation. *J Biol Chem* 284:34390–34399
- Sciutto E, Martínez JJ, Villalobos NM, Hernández M et al (1998) Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol* 79:299–313
- Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, Cervantes J, Aluja A, Larralde C (2013) Development of the S3Pvac vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis: a historical review. *J Parasitol* 99:686–692
- Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E (1999) Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 67:2522–2530
- Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, López-Casillas F (2001) Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 69:1766–1773
- Whiteman LY, Marciano-Cabral F (1987) Susceptibility of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria spp.* to complement-mediated lysis. *Infect Immun* 55:2442–2447
- Whiteman LY, Marciano-Cabral F (1989) Resistance of highly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae to complement-mediated lysis. *Infect Immun* 57:3869–3875