

15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMPOSICION QUIMICA Y ANTIGENICIDAD DE LOS PRINCIPALES GLICOLIPIDOS DEL CISTICERCO DE Taenia solium

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

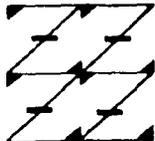
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

PAULO SERGIO ESPINOSA YAÑEZ

ASESOR: DRA. LUZ MARIA LOPEZ MARIN

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXIÓN

MEXICO, D.F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Luz María López Marín, con el financiamiento de CONACYT (Proyecto 33578-M) y DGAPA (Proyecto IN 206600).

Dedicatoria

A Martha C. Yáñez Chirino por su amor, apoyo y guía, con todo mi cariño.

A Ivonne P. y a César A., siempre entusiastas y en búsqueda incansable por ser felices.

A mi familia.

A mis compañeros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de sinodales formado por: Q. Ma. Teresa Mendoza Mata, Dr. Rubén Marroquín Segura, M. Lourdes Castillo Granada, QFB Francisco Javier Parada y la Dra. Luz María López Marín, por sus comentarios en la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Luz María López Marín, directora del proyecto, por su asesoría en la realización del presente trabajo.

A la Biól. Erika Segura Salinas por su asesoría técnica en la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Edda Sciutto y a la Dra. Esperanza García por su aportación de muestras empleadas en este estudio.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por haberme otorgado una beca de licenciatura dentro del Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica.

ABREVIATURAS

- BSA Albúmina sérica Bovina
- CCF Cromatografía en capa fina
- CG/GC Cromatografía de gases
- CG/MS Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas
- ELISA Inmunoensayo enzimático
- GL Glicolípido
- IET Inmunolectrotransferencia
- LCR Líquido cefalorraquídeo
- MALDI Ionización/desorción con láser asistida por matriz
- NCC Neurocisticercosis, muestra de paciente con neurocisticercosis
- PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida
- PBS Solución amortiguadora de fosfatos
- RMN Resonancia magnética nuclear
- TAC Tomografía asistida por computadora
- TOF Detector de tiempo de vuelo

ÍNDICE

Página

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 <i>Antecedentes</i>	3
2.2 <i>Epidemiología de la enfermedad causada por <u>Taenia solium</u></i>	4
2.3 <i>Biología de <u>Taenia solium</u></i>	5
2.4 <i>Infección y enfermedad producida por <u>Taenia solium</u></i>	8
2.5 <i>Diagnóstico de <u>Taenia solium</u></i>	10
2.6 <i>Respuesta inmune en el hospedero de <u>Taenia solium</u></i>	13
2.7 <i>Estructura del cisticerco de <u>Taenia solium</u></i>	15
2.8 <i>Composición del cisticerco de <u>Taenia solium</u></i>	16
2.9 <i>Relevancia de los glicolípidos como componentes de membranas</i>	17
2.10 <i>Fundamento y aplicación de la técnica de espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI)</i>	19

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. OBJETIVO.....	25
5. HIPÓTESIS.....	25
6. METODOLOGÍA.....	26
6.1 Obtención de cisticercos de <i>Taenia solium</i> de carne infectada.....	26
6.2 Infección de ratones Balb/c con cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> y obtención de cisticercos de ratones infectados.....	26
6.3 Extracción de lípidos de cisticercos.....	27
6.4 Fraccionamiento de los extractos totales.....	28
6.5 Monitoreo por cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones.....	29
6.6 Purificación de fracciones enriquecidas.....	29
6.7 Desacilación de glicolípidos (hidrólisis alcalina).....	30
6.8 Cromatografía en capa fina preparativa.....	30
6.9 Cromatografía en cartuchos precargados de sílica gel.....	31
6.10 Eliminación de sílica de productos purificados.....	31
6.11 Hidrólisis ácida de glicolípidos.....	32

6.12 Análisis por cromatografía de gases de los monosacáridos.....	32
6.13 Obtención de antígeno proteico de <u>Taenia crassiceps</u> para la discriminación de sueros positivos a cisticercosis.....	33
6.14 Inmunoensayo enzimático(ELISA) con glicolípidos de <u>Taenia solium</u> contra sueros humanos.....	34
6.15 Inmunoensayo enzimático(ELISA) con glicolípidos de <u>Taenia solium</u> contra sueros de cerdos.....	35
6.16 Inmunoensayo enzimático (ELISA) con glicolípidos de <u>Taenia solium</u> contra LCR de humano.....	35
6.17 Determinación de esfingosina.....	35
6.18 Análisis estructural de GL1.....	36
- Dilucidación de la composición en ácidos grasos.....	36
- Dilucidación de la composición en bases esfingoides.....	37
- Determinación de la masa molecular de GL1.....	37
7. RESULTADOS.....	39
7.1 Composición de los extractos lipídicos de <u>Taenia solium</u> y <u>Taenia crassiceps</u>	39

7.2 <i>Análisis estructural de GL 1</i>	48
7.3 <i>Pruebas de antigenicidad de los compuestos purificados</i>	59
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIONES	69
10. PROPUESTAS Y PERSPECTIVAS	70
11. REFERENCIAS	71

1. RESUMEN

Se investigó la composición y el valor como reactivos de inmunodiagnóstico de glicolípidos del cisticerco de *Taenia solium*.

Los resultados demuestran la presencia de al menos tres clases de lípidos, el primero de ellos glicosilado y estable al álcali, el segundo de ellos glicosilado e inestable al álcali y el restante fosforilado, por lo que los compuestos encontrados se pueden clasificar tentativamente como glicosfingolípidos, glicolípidos que contienen ésteres y fosfolípidos.

Debido a que los glicosfingolípidos de otros parásitos han sido identificados como factores importantes en la interacción parásito-hospedero, se aislaron tres compuestos del cisticerco que podrían corresponder a esta clase de compuestos. Uno de ellos, el más abundante fue analizado más profundamente en cuanto a su estructura química, confirmándose que se trata de un glicosfingolípidos que contenía galactosa, esfingosina y cadenas lipídicas de 16 a 26 carbonos.

Al probar los tres compuestos aislados como antígenos para inmunodiagnóstico con sueros y líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes con neurocisticercosis, se encontró que los anticuerpos en contra de los compuestos aislados, no son capaces de discriminar entre individuos infectados y sanos al usar sueros. En contraste, la presencia de anticuerpos antiglicolípidos resultó ser totalmente específica de individuos con neurocisticercosis en LCR. En este tipo de muestras, la sensibilidad encontrada con el glicosfingolípidos GL 1 resultó ser

de 54.5%. Aunque este antígeno no es útil como antígeno único para la detección inmunológica de neurocisticercosis, resulta de interés como parte de una mezcla de antígenos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

Existen dos especies del género *Taenia* que infectan al hombre: *Taenia solium* (también llamada tenia del cerdo o solitaria) y *Taenia saginata* (tenia de la res). Ambas tenias requieren hospederos intermediarios para completar sus ciclos biológicos. El hombre es el hospedero definitivo obligatorio para ambas tenias. Su ciclo biológico involucra al humano por la ingestión del cisticerco (forma intermedia) al consumir carne de cerdo o res infectada, cruda o mal cocida. La enfermedad producida por estos helmintos de la familia *Taeniidae* en su fase adulta es denominada *teniosis*. Esta enfermedad causada por los adultos de *Taenia saginata* y *Taenia solium* es semejante y por lo general muy benigna, limitándose al parasitismo del gusano adulto en el tubo digestivo; sólo en algunos casos produce trastornos digestivos, pero no de consideración. Sin embargo, aunque las infecciones con el adulto de *Taenia solium* raramente son un problema, su tratamiento es necesario para evitar la infección o autoinfección con los huevecillos que producirán *cisticercosis*.¹

El humano puede contraer la enfermedad propia del intermediario de *Taenia solium* al infectarse con huevecillos liberados por el gusano adulto. La *cisticercosis*, es la enfermedad causada por las larvas del parásito, que pueden alojarse en varios órganos y tejidos, como el músculo-esquelético, cardíaco y nervioso, entre otros. La patología ocasionada por los cisticercos (larvas o metacéstodos, o forma intermediaria) de *Taenia solium*, al contrario de la

producida por la fase definitiva del parásito, es de gran importancia debido al tipo de daños irreparables que desencadena en el hospedero, que van desde lesiones incapacitantes en el área de la lesión hasta la muerte. De ellas, la *neurocisticercosis* es una de las patologías más graves, debida a la presencia de la larva de *Taenia solium* en el Sistema Nervioso Central (SNC). Sin embargo, esta infección puede permanecer sin causar daño o serias consecuencias por largos periodos, dependiendo de la intensidad de los fenómenos inmunoalérgicos, de la cantidad de antígenos liberados por el cisticerco y de la capacidad inmunitaria del hospedero.²

2.2 Epidemiología de la enfermedad causada por Taenia solium

La cisticercosis es muy frecuente en países en vías de desarrollo. Su ocurrencia es mundial, pero principalmente se padece en Latinoamérica (en mayor proporción presentándose en Brasil, México, Colombia, Ecuador y Perú), África, Europa oriental y sur de Asia, con un mínimo estimado de 50 millones de personas infectadas mundialmente.³ Su incidencia está fuertemente relacionada con los problemas socioeconómicos de la población, la falta de educación higiénica y saneamiento básico, deficiencia en la inspección sanitaria de la carne y la falta de continuidad en los programas preventivos de salubridad. Es la parasitosis más frecuente que afecta al SNC y una de las principales causas de padecimiento neurológico en todo el mundo.⁴

En México, este padecimiento se reporta como emergencia epidemiológica en Aguascalientes, Colima, Chihuahua, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos,

Nayarit, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí y Zacatecas⁵. La enfermedad más frecuente es la cerebral; además se presenta las forma ocular, espinal, subcutánea y muscular, en orden de incidencia. En estudios recientes se indica una frecuencia de cisticercosis humana del 2%, en pacientes de hospitales de neurología el 12% (para tenosis es de 0.5% a 1.5%). En el caso de defunciones por cisticercosis las más altas reportadas son en Querétaro, Zacatecas y Aguascalientes con 0.8, 0.64 y 0.65 muertes por 100 000 habitantes. El Estado de México y el Distrito Federal notificaron un mayor número de casos de defunciones por cisticercosis con 47 y 35 muertes notificadas (tasas de 0.45 y 0.43 por 100 000 habitantes) aunque esto se debe probablemente a que estas entidades cuentan con unidades de atención médica de tercer nivel (especialidades) en las cuales los pacientes son referidos con mayor frecuencia. Entre el 1% y 3% de las autopsias en México reportan casos de cisticercosis, de los cuales sólo la mitad presentaron manifestaciones clínicas.^{7,8}

Por otro lado, las pérdidas económicas arrojadas por la infección en ganado porcino en nuestro país se presentan principalmente en la zona del bajo.

2.3 Biología de *Taenia solium*

El adulto de *Taenia solium* es un platelminto (clase céstoda) que se aloja en el intestino delgado (yeyuno) del hospedero humano (hospedero definitivo). Se ancla al tubo digestivo por un órgano de fijación o escólex que contiene dos estructuras, una doble corona de ganchillos y cuatro ventosas. Este escólex armado se une a un cuello, de donde se desarrolla el estrobilo.

constituido por cientos de segmentos llamados *proglótid*es (y que llega a medir hasta 9 metros). Estos últimos pueden ser inmaduros, maduros o grávidos. Los más cercanos al cuello son los más jóvenes y los más lejanos son los grávidos, que contienen miles de huevecillos. Cada segmento maduro es un órgano de reproducción independiente, en donde ocurre fecundación y producción de embriones (Figura 1).^{8,9}

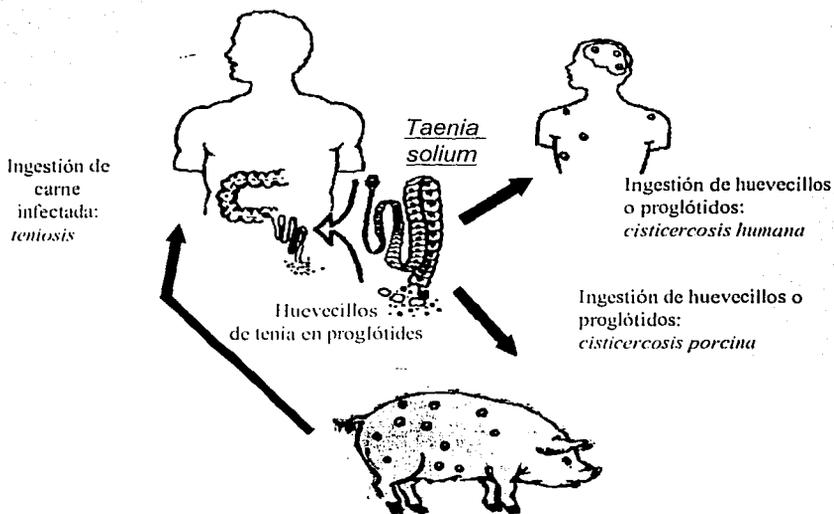


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia solium*.⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La tenia adulta puede producir entre 50 y 100 mil huevecillos por proglótide. Los huevecillos miden aproximadamente 30 μm de diámetro y están rodeados de una capa celular o *vitelo* de donde obtienen sus nutrientes. Más adentro se halla la *membrana oncosferal*, que cubre al embrión hexacanto (por contener 3 pares de ganchillos).

Los huevecillos pueden madurar dentro del ambiente intestinal o pueden pasar de los intestinos a las heces. El excremento del sujeto infectado contamina el ambiente al entrar en contacto con el agua (fecalismo). Su desarrollo continúa cuando los cerdos ingieren la materia fecal contaminada con los huevecillos (muchos de los cuales pueden permanecer viables en el ambiente por meses). Cuando el huevecillo entra al estómago del cerdo, es activado por las enzimas gástricas e intestinales, y con sus ganchos y enzimas puede adherirse a la pared intestinal y atravesarla, hasta llegar al torrente circulatorio o linfático para migrar y llegar al músculo, tejido subcutáneo, sistema nervioso u ojo. El tamaño más constante de estas formas *posoncosferales* es de entre 6 y 8 micras. El embrión establecido en algún órgano (cisticerco) aumenta su tamaño a larva, que se compone de una bolsa que contiene al fluido vesicular y al escólex. La carne de cerdo cocinada inadecuadamente, es por tanto una fuente de transmisión para las larvas.

Los cisticercos continúan su desarrollo cuando el humano ingiere carne de cerdo infectada (hospedero intermediario), cruda o mal cocida. Nuevamente las enzimas y sales biliares inducen su activación, provocando la llamada *evaginación* de la larva, que posteriormente se ancla en el intestino para desarrollarse a gusano adulto entre 3 a 4 meses después de su ingestión, completando el ciclo.

El humano puede infectarse con la fase larval y así adquirir la infección propia del hospedero intermediario. El periodo de incubación de la cisticercosis humana, se reporta desde los 10 días hasta 10 años después de la infección.⁹

2.4 Infección y enfermedad producida por Taenia solium

La primera forma de infección por Taenia solium en el humano es la presencia de la tenia madura o etapa final del organismo. Los síntomas son variables, existen casos asintomáticos, mientras que otros se manifiestan como: diarrea o estreñimiento, mala absorción, y cólico abdominal ligero, u otros como insomnio, anorexia, bulimia o pérdida de peso.

La segunda forma es la infección de la corriente sanguínea por las larvas que finalmente son depositadas en diversos tejidos, frecuentemente en el cerebro. Los humanos pueden infectarse por beber agua contaminada o por lavar legumbres con ella (lo cual produce autoinfección o heteroinfección), especialmente en lugares en donde las heces de los animales infectados contaminan aguas de consumo humano (cisticercosis en India, por ejemplo, en zonas donde no se consume carne de cerdo). La cisticercosis muscular puede producir mialgias y daño incapacitante (hipertrofia) en la zona de la lesión.

Los cisticercos pueden sobrevivir en el SNC de uno a treinta años, actuando como un cuerpo extraño eficazmente adaptado y consiguiendo mantener el mimetismo parásito-hospedero durante largos periodos (la enfermedad dura siete años en promedio). Pueden ingresar al cerebro por dos mecanismos que responden a patofisiologías y sintomatologías diferentes, de

acuerdo con el número de parásitos, el tipo de cisticerco, la viabilidad, la localización y la respuesta inducida frente a ellos.

En el SNC pueden viajar al plexo coroideo donde las larvas ahí depositadas pasan a las arterias menores del sistema ventricular convirtiéndose en quistes, los cuales crecen de tal manera que pueden bloquear el flujo normal del LCR. Cuando dicho flujo es impedido se acumula en los ventrículos. Una gran cantidad de fluido puede acumularse en el cerebro detrás del quiste cisticercal.

Otro modo de infección del SNC es cuando las larvas son depositadas en las arterias menores finales, dentro del tejido cerebral o de la espina dorsal, y pueden penetrar a través de la barrera hematoencefálica y alojarse dentro del tejido. Esto puede compararse con los fenómenos embólicos de células de tumores o coágulos, que se metastacizan a las arterias menores finales.¹⁰

Por otro lado, los cisticercos alojados en tejido cerebral humano pueden ser de dos tipos, racemoso o granuloso. Se ha encontrado que el racemoso aparentemente es una transformación del habitual (celuloso, antes llamado *Cisticercus cellulosae*) que sólo ocurre en el espacio subaracnoideo o en cavidades.

Los signos y síntomas de la neurocisticercosis pueden incluir presión intracraneal aumentada, hidrocefalia, disfunción focal del cerebro, meningitis, mialgias, dolor incapacitante, visión borrosa, ceguera, problemas con el habla o el oído, epilepsia, esquizofrenia y hemorragia cerebral.

Comúnmente las larvas alojadas dentro del tejido mueren por la falta de nutrientes. Si el contenido del organismo se revienta en el espacio subaracnoideo, puede presentarse una meningitis química, la cual puede ser más destructiva y difícil de tratar que los quistes ventriculares o las reacciones inflamatorias parenquimales. No es rara la destrucción de los nervios del cráneo, ni de la espina dorsal o de otras estructuras nerviosas. La inflamación provoca un edema local que puede ser suficientemente significativo para convertirse en una masa en el cerebro, con signos y síntomas de presión intracraneal aumentada como dolor de cabeza, náusea, vómitos o déficit neurológico, según la situación de la reacción inflamatoria. Se pueden probar los esteroides pero la enfermedad con frecuencia progresa a pesar de éstos y muchos pacientes quedan severamente incapacitados con déficits de los nervios del cráneo, cognoscitivos y/o déficits motores.⁸

2.5 Diagnóstico de enfermedad por Taenia solium

En la teniosis, el diagnóstico se realiza por la identificación de los segmentos del estrobilo, los huevecillos y el escólex del parásito. Por lo regular el paciente reconoce la infección cuando elimina con las heces segmentos de parásitos móviles, blancos, planos que miden de 1 a 2 cm de largo o por la presencia de estructuras parecidas a listones. La descripción de los pacientes es por lo general suficiente para un diagnóstico tentativo de teniosis, pero la confirmación se realiza por medio del examen de proglótides.⁸

En la cisticercosis el diagnóstico presuntivo se establece al encontrar calcificaciones en tejidos blandos, los pacientes deben examinarse en forma completa por palpación para buscar nódulos del tamaño de un chícharo. La radiografía de tejidos puede detectar lesiones calcificadas ovales o lineares que miden de 4 x 10 mm a 2 x 5 mm. Las lesiones casi siempre son múltiples, en ocasiones son cientos, y las terminaciones de los quistes con frecuencia se encuentran en el mismo plano de las fibras musculares que los rodean ("aparición de granos de arroz"). En la cisticercosis ocular se puede detectar un cisticerco móvil por examen oftalmoscópico. El diagnóstico se corrobora con la presencia de un escólex (mancha blanca) dentro del quiste. La ultrasonografía y la tomografía también ayudan en estos casos.¹⁰

Para el caso de neurocisticercosis se requieren también varios hallazgos para confirmar el diagnóstico. En el examen de líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentra en forma típica aumento de proteínas y disminución de glucosa. La reacción celular es principalmente de linfocitos y eosinófilos. Estos componentes inflamatorios del LCR aumentan cuando los quistes se desintegran en forma natural o después del uso de prazicuantel.

Las radiografías simples de cráneo pueden demostrar una o más calcificaciones cerebrales. Esto puede ser poco confiable según el grado de necrosis y calcificación que se presente. La tomografía computarizada (TAC) sólo se emplea en laboratorios de tercer nivel por ser de alto costo. Es el procedimiento más útil ya que detecta tanto quistes calcificados como los vivos o no calcificados. Es común encontrar diversas imágenes en la TAC en el mismo paciente, debido a las diferentes etapas de desarrollo entre los cisticercos.

También se emplea Resonancia Magnética Nuclear (RMN) la cual es de gran resolución aunque es aún inaccesible por su costo. Las imágenes RMN son las mejores para observar los quistes dentro de los ventrículos (sobre todo el IV) pero éstas no muestran la calcificación tan bien como los métodos con base en la densidad, tales como la TAC o la normal por rayos X.

Se han empleado gran variedad de técnicas inmunológicas para el diagnóstico de neurocisticercosis, sin embargo, ninguna de ellas ha logrado detectar al cien por ciento los casos, ya que se obtienen resultados falsos positivos en proporciones variables. La mayoría de las pruebas inmunológicas utilizan un extracto crudo de la larva obtenida de carne de cerdo infestada (aunque suelen presentarse algunas reacciones cruzadas). Algunas fracciones puras (como el antígeno B) disminuyen estas reacciones, pero impiden diferenciar entre el diagnóstico de cisticercosis e hidatidosis, y probablemente con otras enfermedades por céstodos, debido a antígenos compartidos por el Phylum. Por otro lado, la prueba serológica negativa no excluye la cisticercosis en cualquier sitio. Algunos estudios argumentan la pobre utilidad de la serología por el alto grado de exposición en algunas zonas. La sensibilidad de las pruebas inmunológicas se reporta entre 70% a 90%.^{8,11-15}

El diagnóstico se puede realizar mediante inmunoelectroforesis y pruebas de doble difusión en gel de agarosa. En pacientes con convulsiones, el 50% presentan títulos séricos positivos pero negativos en LCR; la mayor parte de los individuos presentan sólo lesiones calcificadas con serología negativa. El LCR y el suero son positivos en 70% de los pacientes con meningitis y 95% con hipertensión intracraneana.

También, se practican en forma regular la hemaglutinación indirecta y el inmunoensayo enzimático (Enzyme linked immunosorbent assay o ELISA). Su sensibilidad y especificidad varían mucho y no pueden diferenciar entre cisticercosis y equinococosis. El ELISA se realiza más rutinariamente, empleándose dos antígenos: un extracto total y un antígeno parcialmente purificado. El extracto total corresponde a un conjunto de más de 20 proteínas, cuando se analiza por electroforesis en geles de policacrilamida (PAGE).⁸

Se ha desarrollado una inmunoelectrotransferencia utilizando una fracción enriquecida en glicoproteínas que permite la diferenciación entre cisticercosis e hidatidosis. Recientemente, la experiencia de varios autores en el diagnóstico de la neurocisticercosis permite pensar que este método es el menos variable y el más sensible, ya que es posible detectar el 85% de los casos cuando se emplea suero como muestra, el 95% si es líquido cefalorraquídeo y el 100% si se usan ambas muestras del individuo y antiinmunoglobulinas de las clases IgG e IgA; este último hallazgo ha llevado a investigar algunas fracciones purificadas de glicoproteínas para el diagnóstico en los últimos años.⁸

En general, el hallazgo de anticuerpos en LCR confirma el diagnóstico de pacientes con sintomatología e imágenes de TAC o RMN *compatibles* con cisticercosis.

2.6 Respuesta inmune en el hospedero de Taenia solium

Debido a que el hombre es el único hospedero definitivo del parásito, a que la enfermedad intestinal es pocas veces detectada y a que existen medicamentos altamente eficaces que

eliminan rápidamente al céstodo, no se tienen muchos estudios acerca de la respuesta inmune a teniosis en el humano. Se ha encontrado eosinofilia clásica en los pacientes con teniosis e incremento de los niveles de IgG en suero al momento de la expulsión del céstodo.⁸

Se han realizado más estudios de la respuesta en cisticercosis, y principalmente enfocados a la infección cerebral. En cuanto a la respuesta humoral, los anticuerpos específicos encontrados por inmunoelectroforesis (IEF) son de inmunoglobulina G (IgG) predominantemente. Los anticuerpos encontrados por inmunoelectrotransferencia (IET) y ELISA en el humano son en orden decreciente: IgG 83 %, IgM 50 %, IgA 26 % , IgE 3 %.⁸ Sin embargo, se ha encontrado que no todos los compartimentos del mismo huésped poseen citocinas específicas, lo que dificulta muchas veces el diagnóstico. Otros estudios, han demostrado también la presencia de ciertas citocinas en LCR de pacientes con neurocisticercosis. La descomposición de las larvas alojadas en el tejido libera proteínas y otros factores que son inmunogénicos y provocan una reacción inflamatoria circundante, que suele clasificarse en varios niveles de acuerdo con su estado de desarrollo y presencia de células del sistema inmune. Después de la reacción inflamatoria, el calcio se deposita en el área, el cual forma una área de cicatriz que puede identificarse incluso, si es grande, en radiografías comunes del cráneo o por TAC.

Recientemente en modelos murinos, se ha descrito una respuesta de tipo Th2 sistémica durante la infección, y también una respuesta mixta Th1/Th2. En el modelo *Taenia crassiceps* se ha encontrado la persistencia de un estado tipo Th2 *permissivo* después de un estado *protectivo* inicial tipo Th1; en este modelo se reporta un alto grado de reactividad cruzada con antígenos

de Taenia solium.¹⁶ Se han reportado además altos niveles de células T γ δ en el modelo con Metacestoides corti.¹⁷

Se han sugerido varios mecanismos para explicar la "evasión" del sistema inmune del hospedero. Entre ellos están la existencia de receptores para la porción Fc (involucrando la ingestión de anticuerpos) e inactivación específica de algunas proteínas del complemento. La baja respuesta celular quizá obedezca a una inhibición de linfocitos T cooperadores específicos. Algunos antígenos identificados, como los llamados A y B son muy buenos inmunógenos; se ha encontrado que el antígeno B es una proteína de secreción, por lo cual los anticuerpos específicos contra ella no tienen efecto sobre el parásito, pues reaccionan con un producto externo que probablemente está unido al tejido conectivo del huésped.⁸

2.7 Estructura del cisticerco de Taenia solium

El cisticerco es una vesícula translúcida redonda u ovoide, contiene un escólex invaginado y opaco que posee cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos. La vesícula está llena de un fluido transparente llamado *fluido vesicular*, que contiene proteínas del parásito y del huésped. La superficie de la pared vesicular está formada por el *tegumento*, un citoplasma sinsicial, anucleado y continuo que en su cara externa se encuentra aumentado por proyecciones digitiformes recubiertas por una membrana plasmática con abundante glicocálix. El citoplasma del tegumento contiene mitocondrias y numerosas vesículas. La membrana plasmática o basal que recubre la superficie interna del tegumento se encuentra interrumpida por zonas citoplasmáticas que comunican al tegumento con cuerpos celulares nucleados,

llamados *citones tegumentarios*. Estos citones contienen numerosas vesículas, retículo endoplasmático desarrollado, aparato de Golgi, ribosomas y mitocondrias.^{18,19}

2.8 Composición del tegumento del cisticerco de *Taenia solium*

El tegumento es la estructura parasitaria del cisticerco que interactúa directamente con el hospedero, por lo que muchas funciones son llevadas a cabo por este órgano, desde la protección hasta la regulación del intercambio metabólico. El tegumento del cisticerco está revestido por una cubierta externa rica en carbohidratos llamada *glicocálix*. La zona del glicocálix constituye la interfase hospedero-parásito, y es por tanto de extrema importancia su estudio para establecer los mecanismos que producen la patología.

La presencia de carbohidratos en la superficie de los céstodos se ha demostrado por microscopía electrónica. Se ha encontrado que la concanavalina (ConA) se une selectivamente a la superficie del cisticerco, sugiriendo la presencia de D-manósidos y/o D-glucósidos, siendo su distribución relativamente homogénea. Los glicanos que forman el glicocálix son ensamblados en el citoplasma de los citones y transportados al tegumento por vesículas que se fusionan con la membrana plasmática.

Estudios químicos del glicocálix de los metacéstodos demuestran la presencia de glicoproteínas y glicolípidos.^{18,19} Se ha sugerido que parte del glicocálix contiene componentes integrales de la membrana. Las glicoproteínas estudiadas han demostrado ser muy inmunogénicas y son objeto de estudios especialmente para inmunodiagnóstico. Algunos de

sus grupos ácidos, se han asociado con la habilidad para concentrar cationes y activar enzimas gracias a que proveen sitios de unión para electrolitos. El constante intercambio de sus componentes, por otro lado, permitiría evadir la respuesta del hospedero.⁸

Se han realizado estudios muy completos en los modelos *Taenia crassiceps* y *Taenia taeniformis* en cuanto a la composición lipídica en las larvas²⁰⁻²⁴, y se ha encontrado que ésta varía en los distintos estadios de su desarrollo, lo que hace suponer que estos compuestos desempeñan funciones relevantes a lo largo del mismo. Los glicolípidos constituyen una masa aproximada del 6 % del total lipídico en estas dos especies, entre fosfolípidos y una gran cantidad de lípidos neutrales.²⁰⁻²⁴

2.9 Relevancia de los glicolípidos como componentes de membranas

Los glicolípidos son glicoconjugados anfipáticos que contienen una estructura sacarídica unida a una porción lipídica, comúnmente ceramida. Algunos están compuestos por una base de cadena larga (con frecuencia esfingosina), un ácido graso y un carbohidrato. La sustitución en la ceramida se realiza en el grupo amino, mientras que el carbohidrato se une por el grupo hidroxilo primario de la base esfingoide (Figura 2). Estos compuestos pueden clasificarse: 1) sobre las bases de su porción de carbohidratos, la cual puede ser un sencillo monosacárido o una gran cadena de más de 20 unidades de monosacárido, 2) con base en su polaridad (neutrales, gangliósidos, sulfatados).²⁵⁻²⁷

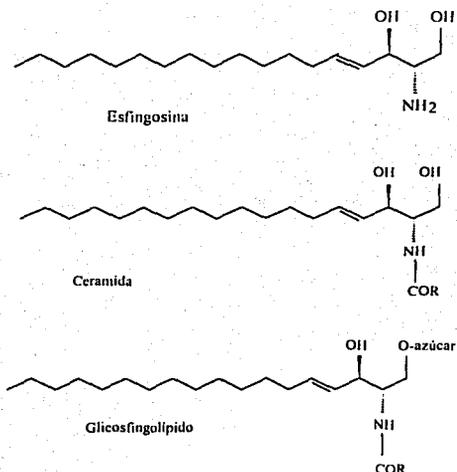


Figura 2. Estructura general de las moléculas de esfingosina, ceramida y glicosfingolípido. El grupo R incluye generalmente ácidos grasos de cadenas de más de 10 carbonos.

En las células, los glicolípidos son componentes de las membranas y su porción hidrofóbica se sumerge en la bicapa lipídica, mientras que la porción sacarídica se extiende hacia el exterior. Desempeñan un papel importante al mediar las interacciones entre las células y la matriz extracelular, la comunicación célula-célula y diversas funciones en el sistema inmune. Especialmente se han estudiado los esfingolípidos a partir de dos hallazgos importantes: 1) los niveles anormales de estos compuestos en varias enfermedades de hígado, cerebro y bazo tales como en el caso de la enfermedad de Niemann Pick y Tay Sachs, 2) la capacidad de los esfingolípidos para modular el comportamiento celular en el nivel de receptores de la

superficie celular y de transducción de señales. Los esfingolípidos específicamente predominan en la superficie externa de la membrana plasmática, de vesículas y organelos intracelulares, aunque algunos (tales como las ceramidas) se hallan también en la membrana intracelular y participan en la transducción de señales. Las rutas de transducción de señales que involucran esfingolípidos incluyen la regulación del crecimiento celular, diferenciación, especialización (tales como respuestas a citocinas) y muerte celular programada (apoptosis). Generalmente sus propiedades biológicas son debidas a su porción sacarídica, aunque recientemente se han encontrado rutas que conllevan a la regulación inmune por medio de la porción ceramida involucrada como un segundo mensajero.²⁸⁻³²

Estudios recientes realizados con la superficie del cisticerco de *Taenia solium*, aunque enfocados a otro tipo de compuestos del tegumento describen la presencia de glicolípidos en la capa externa por medio de tinciones con lectinas. Se han descrito para *Taenia solium* glicolípidos que muy probablemente sean derivados de esfingosina ya que presentan perfiles cromatográficos relacionados con los glicosfingolípidos de *Taenia crassiceps*.

2.10 Fundamento y aplicación de la técnica de espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI)

Aplicaciones de la espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una herramienta analítica concerniente a la capacidad de separación a nivel molecular y atómico de acuerdo con la masa. Las interacciones de las especies neutrales es relativamente baja, así que con el fin de

alcanzar una separación adecuada en el uso práctico es necesario ionizar las especies bajo investigación de tal forma que se pueden usar los principios básicos de partícula y ion para el análisis.³³ La MS puede informarnos lo siguiente:

- Las medidas exactas obtenidas pueden ser usadas para determinar la fórmula empírica del compuesto.
- Las fragmentaciones controladas pueden ser usadas para la elucidación estructural de compuestos novedosos.
- Los restos de los fragmentos específicos de cada compuesto pueden ser usados para identificar muestras por comparación con bases de datos de fragmentos.
- Los picos comunes observados en un espectro pueden dar información útil correspondiente a los grupos funcionales de la molécula.
- La abundancia isotópica relativa es usada para obtener información correspondiente a los elementos que constituyen un compuesto.
- Las mezclas complejas de compuestos pueden ser analizadas vía técnicas de hifenación tales como gases masas y así reducir el tiempo consumido en la purificación.

Análisis molecular por MALDI-TOF (ionización-desorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo). A través del uso de MALDI se pueden introducir moléculas intactas protonadas en fase gaseosa a un espectrómetro de masas, y obtener a partir de los iones los datos de su masa espectral. Existen numerosas formas de separar y seleccionar iones en un

espectrometro de masas. Campos magnéticos y eléctricos son empleados frecuentemente. Los analizadores de masa TOF fueron la elección para adoptar a MALDI, ya que ellos detectan un rango casi ilimitado de masas.

Espectrometro de tiempo de vuelo TOF MS. El espectrometro de masas por TOF es el analizador más simple de masas. El principio de operación de estos espectrometros se basa en que cuando un grupo bien definido de iones de diferente razón masa/carga (m/z) son sujetos al mismo campo eléctrico y se permiten avanzar por una región de campo eléctrico constante, estos avanzarán a través en un tiempo dependiente del cociente m/z de cada uno de ellos en condiciones reproducibles. Un potencial aplicado a través de la fuente es empleado para extraer y acelerar los iones de la fuente hacia dentro de la zona o rango de comienzo del instrumento. En el caso ideal, todos los iones producidos abandonarían la fuente al mismo tiempo con la misma energía cinética, debido a haber sido acelerados a través de la misma diferencia de potencial. En este caso el tiempo de vuelo es dependiente exclusivamente de la masa y de la carga de los iones producidos.

Mecanismo de operación del análisis por MALDI. Este método de ionización de moléculas se considera bastante suave, ya que no produce cantidades de fragmentos como los de otros métodos de ionización. Los analitos son generalmente diluidos en un sistema de disolventes *inertes/organicos* con la matriz. La matriz es un compuesto ácido orgánico que es mezclado en exceso con el analito en proporción uno a mil o diez mil y depositado en la muestra. Un láser ultravioleta es dirigido a la muestra para desorción.

Aunque el mecanismo del MALDI no es completamente entendido, se cree en general que los eventos que ocurren en el análisis son los siguientes:

- La radiación láser es absorbida por las moléculas de la matriz, causando un calentamiento rápido de la región que rodea al área del impacto del láser, y produce la excitación electrónica de la matriz.
- La región cercana inmediata a la muestra literalmente "explota" en el alto vacío del espectrómetro de masas, creando una serie de moléculas protonadas o cationizadas en fase gaseosa de ambos el ácido y el analito.

Así, el propósito de la matriz se puede resumir de la siguiente manera:

1. La matriz sirve para aislar a las moléculas del analito una de otra, así el calentamiento ocurre más en las moléculas de la matriz que en las del analito.
2. La matriz sirve como una fuente de protones para transferir al analito y ionizarlo.
3. La matriz sirve como un medio absorbente de la luz ultravioleta, convirtiendo la energía del láser incidente en energía electrónica molecular.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los síntomas y patología producidos en la neurocisticercosis han derivado en varios estudios hacia el mejor conocimiento del parásito, desde su bioquímica y fisiología hasta la búsqueda de una herramienta útil para su diagnóstico. Estudios previos se han enfocado en modelos de *Taenia saginata*, *Taenia tanieformis* y *Taenia crassiceps*, en los cuales se ha logrado obtener resultados que ayudan a comprender el desarrollo de la enfermedad. Gracias a ellos es que se conoce de varios mecanismos que favorecen el escape del parásito del reconocimiento inmune del hospedero.

Es importante conocer las características bioquímicas del cisticerco para entender la relación entre el hospedero y el parásito. El descubrimiento de mediadores de la inmunomodulación del hospedero despierta un gran interés. Los glicolípidos se hallan en la superficie del parásito, y podrían jugar un papel a ese respecto, por lo que el conocimiento de este tipo de moléculas y la disponibilidad de métodos para su obtención es el primer paso para el estudio biológico de estos componentes.

Por otro lado, el diagnóstico de la neurocisticercosis actualmente se realiza con técnicas de imagen que llegan a ser efectivas para la detección de larvas, sin embargo, su alto costo las hace inaccesibles para la mayoría de la población. El desarrollo de una técnica de inmunoensayo con antígenos altamente sensibles y específicos favorecería la identificación temprana de los pacientes con neurocisticercosis, lo que evitaría los estadios más graves de la

enfermedad. Recientemente se ha reportado que los glicolípidos aislados de *Taenia crassiceps* son reconocidos tanto por los sueros de ratones infectados con cisticercos, como por los de pacientes con neurocisticercosis causada por *Taenia solium*.²⁰ El aislamiento de estos productos permitiría, por tanto, determinar su posible utilidad para el diagnóstico.

Por lo tanto, se propone estudiar la composición química de los glicolípidos más abundantes del cisticerco de *Taenia solium*, desarrollar métodos para su purificación y probar su posible utilidad en el inmunodiagnóstico.

4. OBJETIVOS

1. Determinar los tipos de lípidos existentes en el extracto lipídico de los cisticercos de Taenia solium.
2. Aislar los glicolípidos más abundantes del cisticerco de Taenia solium y describir su composición química.
3. Probar la posible utilidad diagnóstica de los glicolípidos aislados del cisticerco de Taenia solium para inmunoensayo por ELISA.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El análisis de los principales glicolípidos aislados de Taenia solium revelará compuestos novedosos y específicos, cuya purificación permitirá evaluar su posible utilidad como antígenos de inmunodiagnóstico.

6. METODOLOGÍA

La purificación de los glicolípidos se efectuó en tres pasos principales: 1) extracción de los lípidos de la fuente biológica usando disolventes orgánicos, 2) separación gruesa de los principales lípidos y contaminantes no lipídicos 3) resolución cromatográfica y análisis de las especies individuales.¹⁴⁻¹⁵

6.1 Obtención de cisticercos de Taenia solium de carne de cerdo contaminada

Carne de cerdo infectada con cisticercos de Taenia solium (almacenada a -20 °C) se descongeló a 4 °C por 24 horas o se trató inmediatamente después del sacrificio del animal. Trozos pequeños de carne de cerdo se cortaron finamente con un bisturí, y se desprendieron por medio de pinzas de disección. Los cisticercos se enjuagaron en agua destilada con ayuda de una malla o colador varias veces hasta obtener un sobrenadante claro, para eliminar cualquier residuo de la carne del animal.

6.2 Infección de ratones Balb/c con cisticercos de Taenia crassiceps y obtención de cisticercos de ratones infectados

Los cisticercos obtenidos de un ratón recientemente sacrificado se suspendieron en una caja de Petri en solución salina isotónica. Se colocó una pequeña cantidad de ellos para facilitar su

selección. Se emplearon jeringas para insulina de 1 mL para la infección. Éstas se toman sin la aguja y con ella se seleccionaron diez cisticercos de los más pequeños, procurando no exceder un volumen de 0.6 mL. Los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con los cisticercos. El periodo de infección fue de 2 a 3 meses.

El ratón infectado se sacrificó por desnucamiento. La piel del vientre del ratón se limpió meticulosamente con etanol al 70 %. Con ayuda de pinzas de disección se levantó la piel, y se realizó un corte evitando romper cualquier otra estructura, de tal forma que la bolsa peritoneal no liberara los cisticercos. El ratón se volteó cuidadosamente y los cisticercos se vaciaron a una caja de petri con solución salina isotónica o solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.01 M estéril y se enjuagaron con este varias veces. Los cisticercos así obtenidos se trataron igual que los de *Taenia solium*.

6.3 Extracción de lípidos de cisticercos

Se recuperaron los cisticercos liofilizados en un matraz Erlenmeyer de 1 litro y se adicionó una cantidad suficiente de disolvente de extracción (aproximadamente 20 mL por gramo de cisticercos) constituido por una mezcla de cloroformo:metanol:agua 38:19:3 a 37 °C, sonicando el material al final de la extracción durante 20 minutos. Se filtró esta mezcla, se evaporó el disolvente bajo corriente de aire y se repitió una vez más el procedimiento anterior. Los dos residuos se recuperaron y se almacenaron. Al residuo del material inicial se adicionó la mezcla extractora cloroformo:metanol:agua 30:60:8 y se dejó 24 horas a 37 °C, sonicando el

material al final de la extracción durante 20 minutos. Se unieron los tres extractos y se realizó un lavado de Folch. Para ello se adicionó un volumen conocido de mezcla de partición cloroformo:metanol:agua 4:2:1, se agitó cuidadosamente durante algunos segundos y se dejó en un embudo de separación para obtener dos fases. Se separó la fase orgánica de la acuosa, y se concentró en rotavapor cada fase. El extracto etanólico se obtuvo mediante el reflujo de los cisticercos liofilizados en etanol grado reactivo por 6 horas y concentrando en rotavapor posteriormente.

6.4 Fraccionamiento de los extractos totales

La fracción orgánica del extracto de los cisticercos se separó en cromatografía sobre una columna de sílica modificada 60-100 (Florisil Merck, sílica). Se pesó una cantidad de florisil de 30 veces el peso del extracto total y se empacó en la columna con cloroformo. La muestra se disolvió en la cantidad mínima de cloroformo y se aplicó a la columna. La columna empacada con el extracto se corrió desde 100 % cloroformo, con un gradiente creciente de metanol en cloroformo (2,4,6,....,36 %) y a continuación con mezclas eluyentes más polares: cloroformo:metanol:agua 60:16:2, 65:25:4, 60:27:4 y 60:35:8. Se utilizaron tres volúmenes para cada mezcla de elución. Las fracciones se recuperaron en matraces redondos y se eliminó el disolvente por evaporación en rotavapor.

6.5 Monitoreo por cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones

Las fracciones obtenidas por columna se disolvieron en mezclas cloroformo-metanol para analizarse en placas de sílica gel para CCF (Merck). Los disolventes de corrimiento empleados fueron cloroformo:metanol 80:20 para las fracciones más apolares y cloroformo:metanol:agua 60:35:8 para las más polares. Las cromatoplasas se corrieron empleando el disolvente de corrimiento en una cámara para CCF. El revelado de los glicolípidos se realizó con antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico. El reactivo se roció sobre la superficie de la placa, y la placa se calentó a 110 °C por 10 minutos. Las bandas de glicolípidos se observaron de un color azul-verdoso.

6.6 Purificación de fracciones enriquecidas

Para eliminar la mayor cantidad de contaminantes posibles y purificar los productos analizados, se realizó una segunda cromatografía en columna. Las fracciones que contenían glicolípidos fueron subfraccionadas por cromatografía en florisil, utilizando un menor tamaño de partícula 100-200 (Mallinkrodt), y reuniendo aquellas fracciones que por revelado mostraban una misma banda de glicolípidos. Una vez empacada la columna, el extracto fue aplicado y eluido con cloroformo 100 % y después se incrementó la polaridad del eluyente con concentraciones crecientes de metanol en cloroformo, aumentando de uno en uno %. Las bandas de glicolípidos de las nuevas fracciones obtenidas se recuperaron y se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF).

6.7 Desacilación de glicolípidos (Andrés en alemán)

Los ésteres de fosfolípidos, triglicéridos y algunos glicolípidos se escindieron por tratamiento con medio alcalino, bajo condiciones en las cuales las amidas de los ácidos grasos de glucosfingolípidos son estables.

Se disolvió el extracto lipídico en una mezcla de cloroformo:metanol 2:1. Se adicionó un volumen igual de solución de hidróxido de sodio 0.2 N en metanol. Se agitó la muestra y se incubó por una hora a 37 °C. Se neutralizó la solución con unas gotas de ácido acético glacial estimando el pH con tiras (Merck). Se evaporó a sequedad con corriente de aire y se redisolvió el extracto en una mezcla cloroformo:metanol:agua 4:2:1. Se separaron las fases y, de la fase orgánica se recuperaron los glicolípidos desacilados y se evaporaron a sequedad para su análisis por CCF. Para demostrar la desacilación de los glicolípidos obtenidos se reveló con reactivo de antrona. Para observar la presencia de fosfolípidos se empleó azul de molibdeno al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado rociando sobre las placas de sílica desarrolladas. Los compuestos fosforilados se mostraron como bandas azul oscuro, y se comparó su Rf con aquellas reveladas con antrona en la misma placa.

6.8 Cromatografía en capa fina preparativa

Las fracciones purificadas por columna se aplicaron a placas de cromatografía en capa fina preparativa. Se pesaron aproximadamente 20 mg de muestra y se disolvieron en aproximadamente 0.5 ml. de una mezcla de cloroformo:metanol para depositarlos en placas de

20 x 20 cm. La placa se corrió en una mezcla cloroformo:metanol:agua 60:35:8 para los glicolípidos más polares y en cloroformo:metanol 70:30 para los poco polares. La placa se reveló por un extremo con reactivo de antrona para identificar la banda de glicolípido. Con ayuda de una lámpara de UV se marcó la banda del glicolípido con lápiz, la cual se raspó con una espátula. La banda raspada se extrajo en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con mezcla de disolventes cloroformo:metanol 70:30 ó 2-propanol:hexano:agua 55:45:10 a 37 °C por 1 hora con agitación constante. El extracto se filtró y se evaporó por calentamiento a 50 °C bajo corriente de aire. La muestra se analizó por cromatografía en capa fina.

6.9 Cromatografía en cartuchos precargados de sílica gel

El paso final de la purificación de los lípidos fue el empleo de cartuchos de gel de sílica precargados SepPack (Merck). En estos cartuchos se aplicaron alrededor de 20 mg de fracción purificada y se corrió igualmente con un gradiente de metanol en cloroformo de acuerdo con la polaridad del glicolípido. La muestra y el eluyente se colocaron en una jeringa adaptada como reservorio y las fracciones se recolectaron en tubos de ensaye.

6.10 Eliminación de sílica de productos purificados

Según la cantidad de sílica gel que resta como contaminante de los productos obtenidos, se emplearon dos métodos de eliminación. Primero, el producto se pasó por cartuchos de sílica

inversa precargados y se eluyó con una mezcla de cloroformo en metanol al 30%. En segundo lugar, los productos obtenidos de los cartuchos se filtraron por membranas de poro de 0.22 μm .

6.11 Hidrólisis ácida de glicolípidos

A una fracción de aproximadamente 1 mg de glicolípido colocada en un tubo con tapón de rosca, se adicionaron 0.4 mL de ácido trifluoroacético 2 N y se calentó a 110 °C durante dos horas en un baño seco. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se secó bajo corriente de aire o nitrógeno sin calentar. Se resuspendió la muestra hidrolizada en una mezcla de cloroformo:metanol:agua 4:2:1 o éter:agua 1:1, se agitó y se recuperaron por separado las dos fases. En la fase polar se obtuvieron los componentes monosacáridos de la molécula y en la apolar los componentes lipídicos.

6.12 Análisis por cromatografía de gases de los monosacáridos

Los monosacáridos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas GC/MS (CG varían 3300) con una columna de 30 m DB-1 (hidrofílica) de 0.32 μ de diámetro interno. Se prepararon los derivados trimetilsililados volátiles. Para ello, a la muestra hidrolizada se añadieron 8 gotas de piridina, 4 gotas de hexametildisilazano y 2 gotas de trimetilclorosilano. Se agitó la muestra y se dejó reposar durante 5 minutos. La muestra fue

evaporada bajo corriente de nitrógeno sin calentar. El residuo se disolvió en éter de petróleo (aproximadamente 0.5 mL) y se analizó por cromatografía de gases, utilizando azúcares comerciales como estándares y corriendo en CG a 150-250 °C a una velocidad de 4 °C/min con un Detector de Ionización de Flama (FID), temperatura del inyector: 260 °C y del detector: 310 °C.

6.13 Obtención de antígeno proteico de Taenia crassiceps para la discriminación de sueros positivos a cisticercosis (1ª selección de sueros por ELISA con fluido vesicular).

Para las pruebas serológicas los sueros de pacientes positivos comprobados por cirugía se ensayaron empleando antígeno proteico de Taenia crassiceps (fluido vesicular). Cisticercos de Taenia crassiceps fueron recuperados en tubos para centrifuga de plástico y se lavaron con solución salina isotónica fría (en baño de hielo) dejándolos sedimentar hasta obtener un sobrenadante claro. Los cisticercos se filtraron por medio de papel Whatman No. 1 y se dejaron escurrir sin dejarlos secar totalmente. Los cisticercos se centrifugaron después a 4 °C a 14,000 r.p.m. El sobrenadante obtenido (fluido vesicular) se recolectó en frío dentro de tubos de 2 mL (Eppendorf) y se guardó en congelación hasta su cuantificación. Se cuantificó el contenido proteico de fluido vesicular de cisticercos de Taenia crassiceps según el método de Lowry. Se preparó una dilución en buffer de carbonatos del extracto proteico a manera de obtener una solución de 10 µg/mL.

Para el ELISA se sensibilizaron placas especiales para proteínas Nunc Maxisorp. Se saturaron placas con 200 μL /pozo de una solución al 3 % de albúmina sérica bovina (BSA) en solución salina de fosfatos (PBS) 0.01M Tween 0.3 % durante 1 hora y se lavó después con PBS 0.01M Tween 0.3%. Se colocaron 100 μL de dilución 1 a 100 del suero en BSA 0.3 % en PBS 0.01 M Tween 0.3 % y se incubó por 1 hora. Se lavó con PBS 0.01 M Tween 0.3 %. Se adicionó anti-IgG humana conjugada a fosfatasa (enzima) diluida 1 a 5,000 en BSA al 0.3 % en PBS. Se incubó 1 hora a 37 °C. Se lavó 5 veces con una solución de BSA al 0.3 % en PBS. Se adicionaron 100 μL de *p*-nitrofenilfosfato diluido (1mg/mL) en solución amortiguadora de dietanolamina (sustrato). Se incubó a 37 °C durante 15 min o el tiempo necesario hasta obtener de 0.3 a 1.0 unidades de densidad óptica en un lector de microplacas a 405 nm.

6.14 Inmunoensayo enzimático(ELISA) con glicolípidos de Taenia solium contra sueros humanos

Se usaron placas especiales para lípidos (Nunc Polysorp) y se sensibilizaron con el antígeno disuelto en 100 μL de etanol:hexano 1:1 a una concentración de 1 μg por pozo. El disolvente se evaporó incubando una noche a 37 °C. Se bloquearon las placas con 200 μL de una solución al 3 % de BSA en PBS 0.01 M por 1 hora a 37°C. Se lavó 5 veces con PBS. Se colocaron 100 μL de suero diluido 1 a 100 en una solución al 0.3 % de BSA en PBS. Se incubó 1 hora a 37 °C. Se lavó 5 veces con PBS. Se adicionaron 100 μL de anti-IgG humana conjugada a fosfatasa (enzima) diluida 1 a 5,000 en BSA al 0.3 % en PBS. Se incubó 1 hora a 37 °C. Se lavó 5 veces con una solución de BSA al 0.3 % en PBS. Se adicionaron 100 μL de

p-nitrofenilfosfato diluido (1mg/mL) en solución amortiguadora de dietanolamina (sustrato). Se incubó a 37 °C durante 15 min o el tiempo necesario hasta obtener de 0.3 a 1.0 unidades densidad óptica en un lector de microplacas a 405 nm.

6.15 Inmunoensayo enzimático(ELISA) con glicolípidos de Taenia solium contra sueros de cerdos

El procedimiento es idéntico al anterior, empleando conjugado anti-IgG de cerdo en lugar del conjugado anterior.

6.16 Inmunoensayo enzimático (ELISA) con glicolípidos de Taenia solium contra LCR de humano

El procedimiento es idéntico que el descrito en 6.14, pero utilizando LCR diluido 1:10 en lugar de suero diluido.

6.17 Determinación de esfingosina

100 µg del glicoesfingolípido se disolvieron en 0.5 mL de ácido clorhídrico (HCl) 6N y se incubaron en un tubo cerrado a 110 °C durante 18 horas. La solución obtenida se neutralizó a pH 8.5 con 3 mL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1M y se adicionaron 0.5 mL de cloruro de

dansilo en solución de 0.4 mg/mL de acetona. La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se extrajo tres veces con acetato de etilo. El extracto se llevó a un volumen de 10 mL. Se midió la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 340 nm y emisión de 510 nm.

6.18 Análisis estructural del compuesto GL1

Dilucidación de la composición en ácidos grasos

Se fragmentó el compuesto GL1 purificado con ácido clorhídrico 1.5 N en metanol durante 20 h a 80 °C, o con una mezcla de metanol:ácido clorhídrico concentrado:agua 83:8.6:9.4. Los ésteres metílicos formados con la reacción sin agua, o los ácidos grasos libres fueron extraídos con *n*-hexano, y *O*-metilados según el procedimiento de Hakomori con carbanión de metilsulfínilo de litio y yoduro de metilo³⁰. Los productos resultantes fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con fuente de impacto electrónico. La columna usada fue OVI (12 m, HP-1, Hewlett Packard), usando Helio como gas eluyente. La separación se llevó a cabo con un gradiente de temperatura de 100 °C a 290 °C a una velocidad de 5 °C/min. Para el impacto electrónico se utilizó un potencial de ionización de 70 eV a 200 °C.

Dilucidación de la composición en bases esfingoides

Se fragmentó el compuesto GL1 con ácido clorhídrico 1.5 N en metanol durante 20 h a 80 °C, o con una mezcla de metanol:ácido clorhídrico concentrado:agua 83:8.6:9.4. Los ésteres metílicos formados con la reacción sin agua, o los ácidos grasos libres fueron extraídos con *n*-hexano, y las bases esfingoides, que permanecen en la fase metanólica, son extraídas con éter etílico después de haber alcalinizado el medio³⁶. Las bases obtenidas son *N*-acetiladas, transformadas en derivados trimetilsililos³⁷ para luego ser separadas y analizadas por GC-MS, utilizando condiciones iguales a las de ácidos grasos excepto el gradiente de temperatura, que fue de 200 a 290 °C.

Determinación de la masa molecular de GL1

Para deducir el número de azúcares presentes en GL1, se determinó su masa molecular mediante espectrometría de masas con ionización láser. Mediante este método de ionización, las moléculas no se fragmentan y el análisis resulta en un espectro que contiene iones llamados pseudomoleculares, ya que contienen la molécula intacta, adicionada de un catión. En este caso, las moléculas contienen un Na⁺, que, aunque en proporción de trazas, es el catión más abundante dentro de la mezcla con GL1, matriz y solvente.

El GL1 intacto fue analizado en un espectrómetro de masas con fuente de iones láser asistida por matriz, y los iones analizados mediante un instrumento de tiempo de vuelo (Perspective Biosystems, Framingham, MA). Los espectros fueron colectados utilizando un voltaje de

aceleración de 20 kV. La matriz utilizada fue el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10mg/mL) y la muestra se disolvió en metanol:cloroformo 1:1.

7. RESULTADOS

7.1 Composición de los extractos lipídicos de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*.

El análisis del extracto orgánico obtenido de los cisticercos de *Taenia solium* mostró la presencia de glicolípidos abundantes por medio de cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos crudos. El rendimiento del extracto orgánico total, obtenido por extracción por el lavado de Folch y concentración de la fase clorofórmica fue de 13% del peso seco total de cisticercos, siendo la fuente más rica de estos compuestos para nuestro estudio, como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los diferentes extractos de cisticercos de *Taenia solium*.

Tipo de extracto	Cantidad de extracto crudo (g)	Abundancia del extracto por cisticercos en peso seco (%)	Composición general
Clorofórmico (orgánico total)	4	13	Glicolípidos, glicosfingolípidos, fosfolípidos, grasas
Etanólico	0.5	0.6	Mismos que el orgánico
Acuoso	0.5	0.6	Glicolípidos, fosfolípidos

Del extracto de la fase acuosa del mismo lavado de Folch se obtuvieron aproximadamente 0.5 gramos.

El extracto etanólico obtenido por reflujo de los cisticercos liberó 0.5 gramos de producto. Los compuestos encontrados en estos extractos presentaron una mejor resolución de glicolípidos por CCF utilizando mezclas polares de disolventes de corrimiento, tales como cloroformo:metanol:agua 60:35:8.

Los análisis por cromatografía en capa fina a los extractos obtenidos tanto de Taenia solium como de Taenia crassiceps han revelado que comparten varios compuestos lipídicos.

Se detectaron varios tipos de glicolípidos en la fase orgánica (Figura 3), los cuales se separan sobre una columna en Florisil con eluyentes entre el 10% y el 30 % de metanol en cloroformo, mientras que otros fueron obtenidos con mezclas de eluyentes más polares, como cloroformo:metanol:agua 60:35:8. En la Tabla 2 se muestran los disolventes empleados para fraccionar el extracto lipídico de Taenia solium.

Tabla 2. Plan de disolventes de corrimiento empleados para cromatografía en columna abierta para fraccionamiento de extracto orgánico de *Taenia solium*.

Orden de corrimiento	Disolvente	Composición
1	Cloroformo	100% cloroformo GR
2	Mezclas de cloroformo y metanol de polaridad creciente	98% cloroformo 2% metanol, 96% cloroformo 4 % metanol... hasta 62% cloroformo 38 % metanol
3	Mezclas de cloroformo, metanol y agua de polaridad creciente	60:16:2 65:25:4 60:35:8 45:45:10

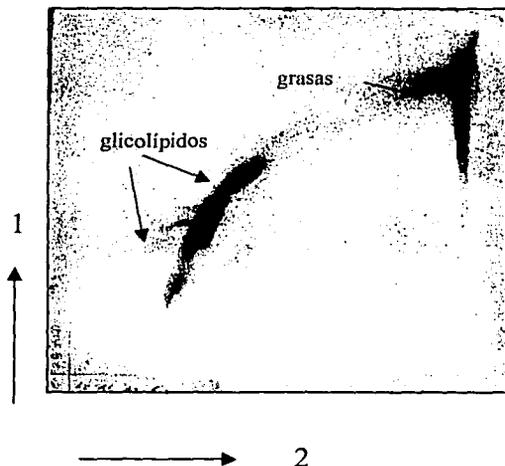


Figura 3. Análisis por CCF bidimensional de la fracción orgánica de los lípidos de *Taenia solium*. Disolventes de corrimiento: cloroformo:metanol:agua (60:35:8), dirección 1, y cloroformo:metanol:agua (45:45:10), dirección 2. Revelado con antrona.

El extracto etanólico mostró glicolípidos similares al extracto cloroformico, pero con mucho menor rendimiento. Al realizarse cromatografías en placas preparativas se obtuvieron aproximadamente 5 mg de producto purificado. En la fracción etanólica total corrida en doble dimensión se pueden distinguir al menos 8 glicolípidos (Figura 4).

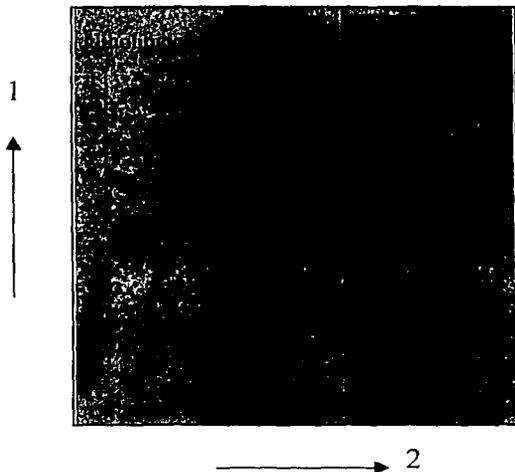


Figura 4. Análisis por CCF bidimensional de la fracción etanólica total de *Taenia solium*. Disolvente de corrimiento cloroformo:metanol:agua (60:35:8), dirección 1, y cloroformo:metanol:agua (45:45:10), dirección 2. Revelado con antrona.

La caracterización química preliminar de los glicolípidos de *Taenia solium* envolvió los siguientes pasos:

- a) Purificación por cromatografía en columna, en cartuchos precargados de sílica y en CCF preparativa de los glicolípidos más abundantes.
- b) Análisis generales que involucraron, además de los revelados específicos y la prueba de resistencia al álcali, como se mencionó anteriormente, la prueba para determinar la presencia de esfingosina.

c) Dilucidación estructural de los compuestos purificados (debido a la cantidad requerida, sólo para el más abundante, GL1).

Los resultados del revelado químico de las cromatografías en capa fina (Figura 3), mostraron 3 tipos de compuestos principales en el extracto orgánico de *Taenia solium*. El revelado con reactivo de antrona muestra la presencia de glicolípidos. En el extracto orgánico, que fue el mejor caracterizado en este estudio por su mayor riqueza de compuestos, se encontraron 3 glicolípidos principales (a Rf de 0.75, 0.47 y 0.31 en disolvente de corrimiento cloroformo:metanol:agua 60:35:8). Estos componentes fueron nombrados GL1, GL2 y GL3 y purificados para su evaluación como antígenos de inmunodiagnóstico. De ellos, el GL1, que es el más abundante (30 mg purificados) fue el único aislado en cantidad suficiente para una caracterización química posterior. Los compuestos GL2 (10 mg) y GL3 (5 mg) son menos abundantes. El llamado GL3 está compuesto por al menos 2 tipos de glicolípidos, según se detectó por revelado con antrona en CCF.

El revelado químico con reactivo de Dittmer (Azul de Molibdeno) mostró la presencia de fósforo en las bandas de GL2 y GL3, lo que hacía suponer la presencia de una mezcla de glicolípidos, fosfolípidos o glicofosfolípidos en este extracto. Posteriormente, análisis cromatográficos en diferentes tipos de disolventes mostraron que el GL3 es una mezcla de glicolípidos y fosfolípidos no glicosilados.

Por otro lado, la prueba química de labilidad a tratamientos alcalinos suaves resultó sin efecto para las zonas GL1 y GL2, lo que sugiere la presencia de compuestos de tipo glicosíngolípido, que son resistentes a este tratamiento. Posteriormente se comprobó la

estructura preliminar en estos compuestos al resultar positiva la prueba para determinación de esfingosina.

En la Figura 5 se muestra un análisis de las fracciones obtenidas por procedimientos cromatográficos, enriquecidas en dos de los glicolípidos posteriormente purificados.



Figura 5. Análisis por CCF de las fracciones obtenidas del extracto orgánico total de *Taenia solium* por cromatografía en columna de Florisil, con concentraciones crecientes de metanol en cloroformo. Se observan los compuestos GL1 y GL2 como zonas azuladas. Disolvente de corrimiento cloroformo:metanol (80:20). Revelado con antrona.

En la Figura 6 se muestra una CCF bidimensional del compuesto GL1 purificado. Puede observarse un patrón de migración característico de glicolípidos, que sugiere que el producto purificado contiene una mezcla de compuestos homólogos que varían ligeramente en la composición de sustituyentes.

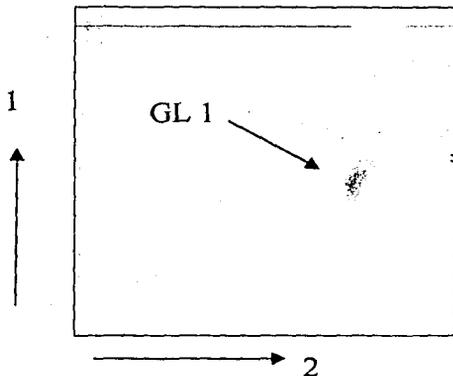


Figura 6. Análisis por CCF bidimensional del GL 1 purificado. Disolventes de corrimiento 1-propanol:cloroformo:hexano:metanol:agua (5:5.5:5:2.1:1.8), dirección 1, y cloroformo:metanol (70:30), dirección 2. Revelado con antrona.

En la Figura 7 se muestra el patrón de migración de GL-1 comparado con el de dos glicolípidos conocidos, el GM 1 y el GM 3, que se encuentran ampliamente distribuidos en las membranas celulares. Puede notarse la diferencia de polaridad que se establece entre estas moléculas debido a la presencia de sustituyentes altamente polares en los compuestos GM 1 y GM 3, lo que también sugiere que el compuesto purificado no contenía sustituyentes ni impurezas de alta polaridad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

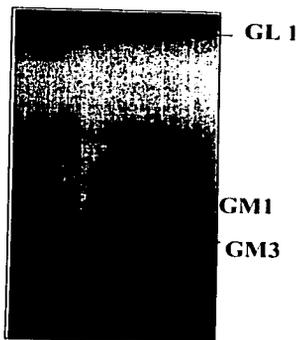


Figura 7. Análisis por CCF de GL1 de *Taenia solium*. Disolvente de corrimiento cloroformo: metanol: agua (60:35:8). Revelado con antrona.

7.2 Análisis estructural de GL 1

Cada componente del compuesto GL 1: azúcares, ácidos grasos y bases esfingoides fueron analizados por separado.

Composición en azúcares

El análisis de la composición sacarídica del GL 1 se realizó después de una ruptura ácida del compuesto, mediante CG. De acuerdo con el patrón de migración de la muestra, comparada con estándares comerciales, el único constituyente sacarídico detectado fue la galactosa.

Composición en ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron también liberados por hidrólisis ácida del GL 1 y *O*-metilados por reacción con diazometano. Su análisis fue realizado por cromatografía de gases, y análisis confirmatorios fueron obtenidos por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con ionización por impacto electrónico.

De acuerdo con el tiempo de elución comparado con el de estándares comerciales, los ácidos grasos constituyentes del GL 1 incluyen ácidos grasos de cadena normal C16, C18, C20, y C22, así como ácidos grasos α -hidroxilados C16, C20, C22, C24 y C26 (Figura 9).

La espectroscopía de masas es una herramienta excelente para determinar la estructura de los ácidos carboxílicos. Mediante esta técnica es posible determinar tanto la masa molecular de los ácidos, como el tipo y la posición de ramificaciones y otros tipos de sustituyentes, como un hidroxilo. Por ejemplo, un ácido graso lineal no ramificado en

posiciones cercanas al grupo carboxilo presentará una ruptura característica, dando lugar a un fragmento con 74 unidades de masa atómica (Figura 8).

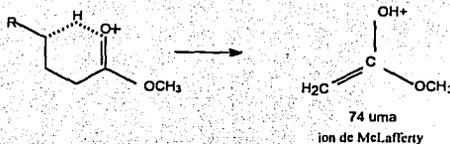


Figura 8. Formación del ion de McLafferty (74 uma) por ruptura de ácidos grasos O- metilados de cadena lineal.

Por su parte, un ácido graso hidroxilado en posición 2, como probablemente estaban contenidos en el GL 1 según el análisis por CG, daría lugar principalmente a una fragmentación en donde el grupo carboxilato se desprende quedando un fragmento con el grupo OH-metilado.

Para confirmar la estructura de estos componentes se realizó un análisis por espectroscopía de masas con ionización por impacto electrónico a cada uno de los picos mostrados en la Figura 9.

Los ácidos grasos del GL 1 mostraron dos tipos de patrones de ruptura:

- a) Patrones con un ion molecular, es decir, en donde el éster graso completo estaba ionizado, y con un ión a 74 uma, y
- b) Patrones con un ion molecular además de un ión fragmento en donde el grupo carboxilato se había desprendido.

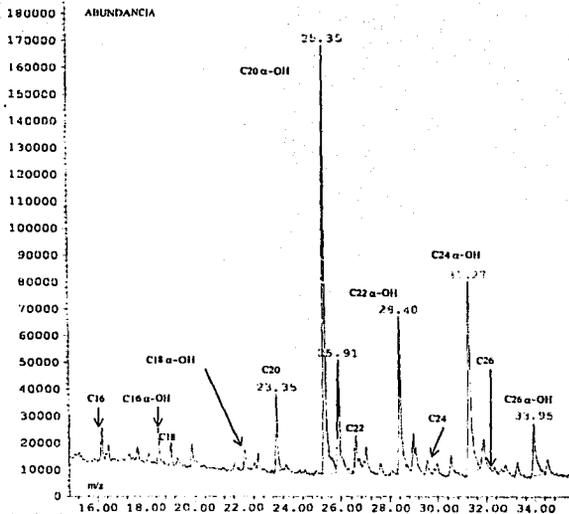


Figura 9. Perfil de CG de la porción lipídica del GL 1 de *Taenia solium*.

Asimismo, la ausencia de otros iones fragmento importantes demuestran que los ácidos grasos no contienen ramificaciones en su cadena (la presencia de ramificaciones habría generado rupturas laterales de gran abundancia). En la Figura 10 se muestran los dos tipos de espectros de cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG/MS) obtenidos con los ácidos grasos *O*-metilados del GL 1.

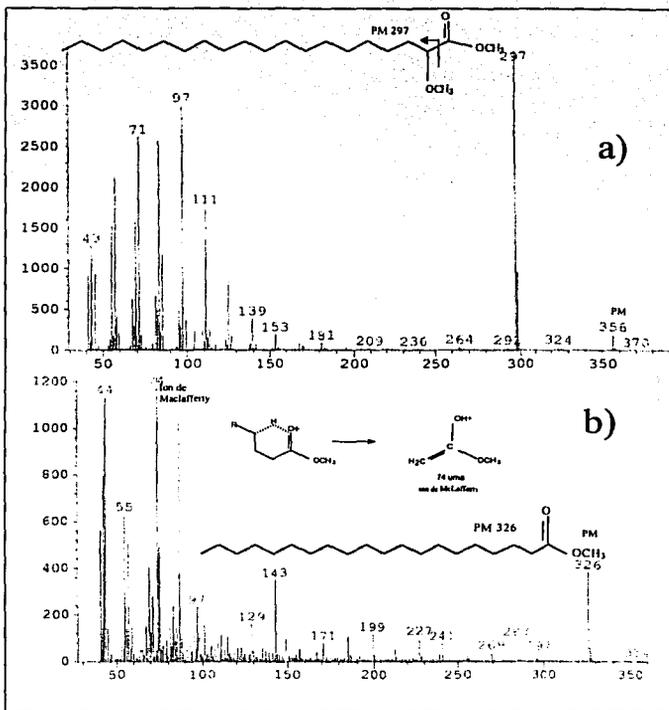


Figura 10. Espectros típicos de CG/MS de residuos individuales de la fracción lipídica del GL 1 de *Taenia solium*. a) espectro de un ácido graso α -hidroxilado en donde se muestra el desprendimiento del grupo carboxilato, b) espectro de un ácido graso lineal.

Con estos análisis se estableció la composición de ácidos grasos constituyentes del GL 1 descrita en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición porcentual de ácidos grasos del GL 1 de *Taenia solium*.

Ácido graso	Lineal	α -hidroxilado
16:0	0.56	1.32
18:0	0.57	1.32
20:0	3.82	20.94
22:0	2.86	13.29
24:0	2.47	29.48
26:0	1.72	21.65
% total	12.00	88.00

Estructura de las bases esfingoides

El GL 1 fue sometido a una hidrólisis ácida. Las bases esfingoides fueron separadas de los ácidos grasos mediante una partición en *n*-hexano-metanol-agua, después de la cual las bases quedan en la fase acuosa y los ácidos grasos en la orgánica. Las bases esfingoides libres fueron posteriormente *N*-acetiladas y *O*-trimetilsililadas para su análisis por CG y por CG/MS. En la Figura 11 se esquematiza la serie de pasos realizados para el análisis de las bases.

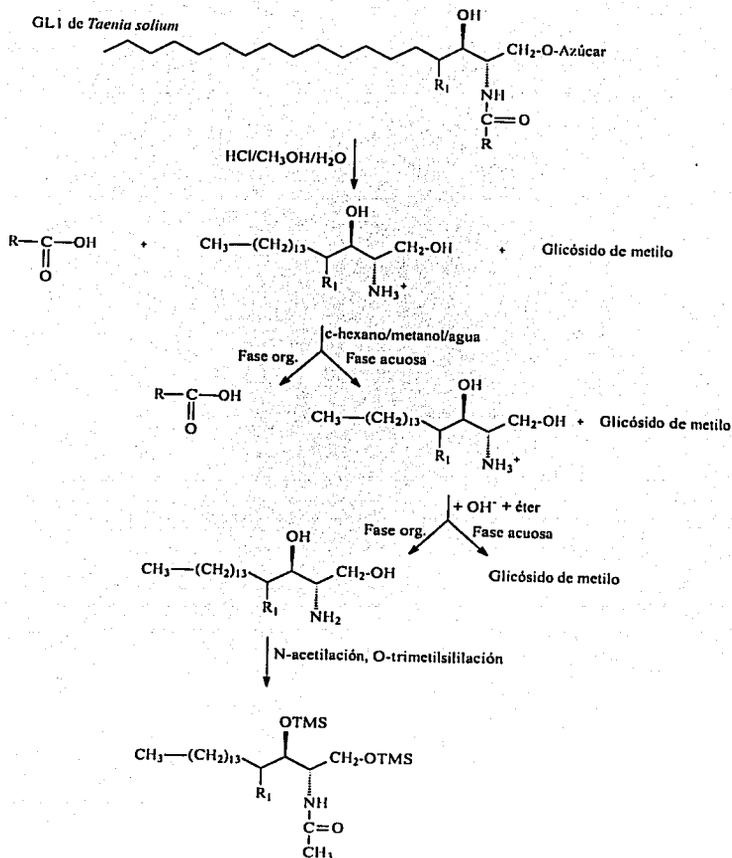


Fig. 11. Pasos para la obtención de ácidos grasos y de bases esfingoides que constituyen el GLI de *Taenia solium*. TMS = -Si-(OCH₃)₃ (trimetilsililo), R = cadenas grasas de ácido graso, R₁ = -H (esfinganina) o -OH (fitosfinganina), R₂ = -H (esfinganina) o -OTMS (fitosfinganina). GLI de *Taenia solium*.

El cromatograma de las bases esfingoides derivatizadas mostró dos picos predominantes que eluyeron a los 10.14 y 11.19 min (Figura 12a). Para dilucidar la estructura de cada componente, las bases fueron sometidas a espectroscopia de masas por impacto electrónico. Los espectros correspondientes (Figura 12b y 12c) mostraron señales a 472 y 560 uma, las cuales corresponden a pseudomoléculas (M-15) de esfinganina y fitosfinganina, respectivamente. Adicionalmente, cada espectro mostró los iones fragmento esperados para cada una de estas dos bases esfingoides.

De acuerdo con los anteriores análisis, el GL 1 es un glicosfingolípido compuesto de una base esfingóide que puede ser esfinganina o fitosfinganina, un ácido graso variable y galactosa. A fin de conocer cuantas unidades de galactosa se encontraban presentes en el GL 1, se procedió a determinar su masa molecular.

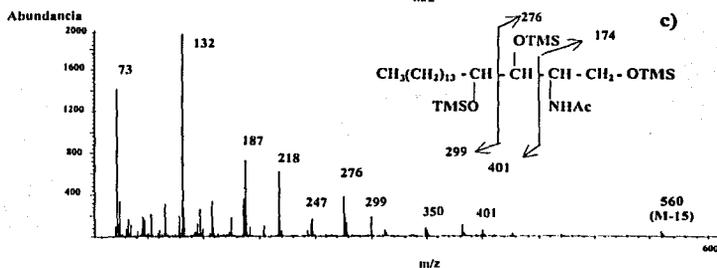
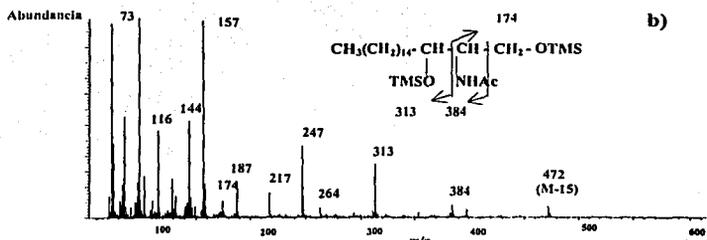
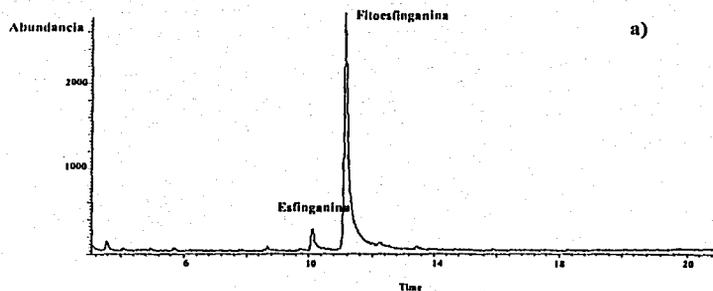


Figura 12. a) Perfil en CG de bases esfingoides ramificadas derivatizadas del GL 1 de *Taenia solium*. y espectros típicos de CG/MS de los derivados de bases esfingoides b) esfinganina y c) fitoesfinganina.

Masa molecular del GL 1

En la Fig. 13 se muestra el espectro de masas MALDI-TOF del GL1 purificado.

El análisis del compuesto GL-1 por espectroscopía de masas con ionización con láser (MALDI) mostró iones pseudomoleculares $(M+Na)^+$ a 724.72, 740.72, 768.74, 780.78, 808, 836, 824.81, 525.85, 864, 880.92, 892 y 908.7 uma. Comparando la tabla de resultados de PM teóricos y los obtenidos por MALDI, un residuo de azúcar y ya sea fitosfinganina con residuos no hidroxilados o 2 hidroxilados o esfinganina con residuos 2 hidroxilados es la configuración estructural encontrada para el GL 1 de acuerdo con el espectro de iones encontrados. Un resumen de los juegos de moléculas dilucidadas correspondientes a los diferentes pesos se muestra a continuación en la Tabla 4.

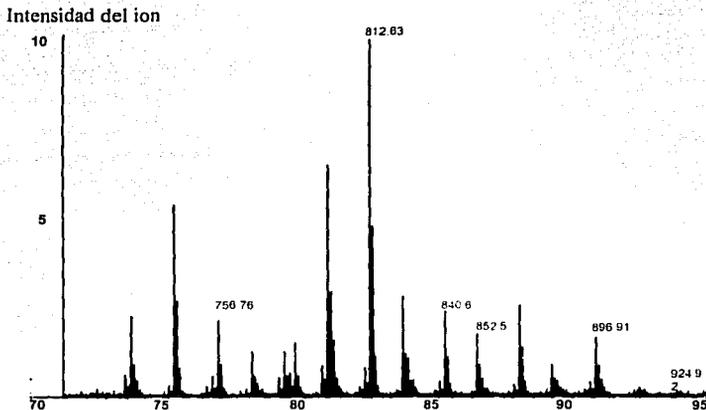


Figura 13. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF del GL 1.

Tabla 4. Resumen de la composición de GI-1 según análisis por MALDI

Componentes de la molécula glicosfingolípida	Peso molecular del ion pseudomolecular teórico
Esfinganina	724 (C16)
Galactosa	780 (C20)
Ácido graso lineal (C)	
Fitosfinganina	796 (C20)
Galactosa	824 (C22)
Ácido graso lineal	852 (C24)
	880 (C26)
Esfinganina	796 (C20)
Galactosa	824 (C22)
Ácido graso 2-hidroxilado	852 (C24)
	896 (C26)
Fitosfinganina	812 (C20)
Galactosa	840 (C22)
Ácido graso 2-hidroxilado	868 (C24)
	880 (C26)

En resumen, el análisis para dilucidar la estructura química para los compuestos GL1 arrojó los siguientes resultados:

1. Estructura estable al álcali (glicosfingolípido). El análisis por CCF posterior a su purificación mostró patrones de corrimiento con desdoblamientos (Figura

- 5) con diferentes sistemas de elución. Esto es una característica de elución frecuentemente encontrada para glicolípidos con heterogeneidad en sus motivos grasos.
2. El análisis por cromatografía de gases (CG) de los azúcares de este glicolípido reveló la presencia de galactosa como único componente osídico. Para su detección se emplearon estándares de galactosa, glucosa, manosa, arabinosa y rhamnosa.
 3. Esfingosina, por derivatización con cloruro de dansilo. Debido al resultado positivo de esta prueba y al resultado del punto 1, se concluye que la estabilidad al álcali es conferida por la esfingosina, por lo que se concluye que el compuesto es un glicosfingolípido.
 4. Los ácidos grasos de 16 a 26 carbonos, sin dobles ligaduras, no hidroxilados o 2-hidroxilados (por GC/MS). Las bases esfingoides son: esfinganina y fitosfinganina (por GC/MS). Se trata, por lo tanto, de un glicosfingolípido (galactosil-ceramida) con variaciones en la parte de ácido graso y en la parte de la base esfingoide, lo que explica el patrón heterogéneo de migración en CCF.
 5. Por MALDI-MS, la masa molecular de los homólogos corresponde a glicosfingolípido con un solo azúcar, y se pueden armar (con las masas obtenidas) galactosil-ceramidas con las combinaciones de ácido graso-base esfingoide encontradas con los análisis cromatográficos.

7.3 Pruebas de antigenicidad de los compuestos purificados

Ya que glicosfingolípidos neutros, como el aquí descrito, han sido propuesto como reactivos valiosos para el serodiagnóstico de varias enfermedades parasitarias, el producto GL1 fue evaluado como reactivo de diagnóstico por ELISA. Para ello utilizamos sueros y líquidos cefalorraquídeos. Las muestras de sueros fueron elegidas con base en diagnósticos clínico y serológico utilizando antígeno proteico de *Taenia crassiceps*.

El inmunoensayo enzimático con sueros fue realizado utilizando 15 sueros positivos a neurocisticercosis y 20 sueros de donadores sanos. Como puede observarse en la Figura 14, en estos ensayos no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de sueros. De igual manera, ninguna diferencia fue encontrada al utilizar los productos GL-2 y GL-3. La posibilidad de que cisticercos alojados en sitios anatómicos diferentes al sistema nervioso pudieran estar interfiriendo en esta prueba fue descartada, ya que 6 de las muestras provenían de una zona geográfica libre de *Taenia solium*, el sudoeste de Francia.

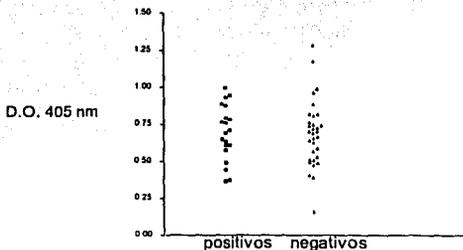


Figura 14. Gráfico de resultados del ELISA con GL 1 como antígeno ensayado con sueros de pacientes con neurocisticercosis (positivos) y donadores sanos (negativos).

Los líquidos cefalorraquídeos para el ensayo del producto fueron obtenidos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Estas muestras provenían de pacientes con sintomatología relacionada con la neurocisticercosis. En la Tabla 6 se muestran los diferentes tipos de sintomatología, así como el diagnóstico establecido mediante técnicas de tomografía y resonancia magnética nuclear. De las 18 muestras obtenidas, 11 correspondían a pacientes con neurocisticercosis confirmada, mientras que 7 eran de individuos con otros padecimientos neurológicos. Al evaluar el GL1 como antígeno en este tipo de muestras, encontramos que, aunque no todos los individuos con neurocisticercosis reconocieron el GL1, este reconocimiento sí fue totalmente específico (Tabla 6, Fig. 15). Utilizando un valor de corte equivalente al promedio de lecturas obtenidas con las muestras de individuos con otras enfermedades más dos veces la desviación estándar ($\bar{X} + 2DE$), la sensibilidad del ensayo fue de 54.5%, con una especificidad del 100%.

Tabla 6. Datos clínicos de los pacientes cuyos LCR fueron estudiados y resultados del ELISA utilizando una dilución 1:10.

Código de la muestra	Diagnóstico	D.O.	Pacientes NCC	Resultados positivos
20815	NCC mixta	0.011	X	
20834	Migraña, epilepsia criptogénica	0.003		
20871	Crisis de inicio tardío en estudio	0.003		
20872	Crisis complejas parciales	0.018		
20887	Enfermedad de Parkinson	0.010		
20896	Probable esclerosis múltiple	0.000		
20905	Hemorragia subaracnoidea	0.005		
20934	Crisis parciales complejas/problema de personalidad	0.006		
20953	Epilepsia de inicio temprano secundaria a NCC / NCC fase coloidal	0.002	X	
21864	Hidrocefalia por NCC / NCC mixta	0.005	X	
21892	Hipertensión por NCC, aracnoiditis / múltiples granulomas	0.005	X	
21925	NCC mixta, parenquimatosa y subaracnoidea	0.574	X	X
21962	NCC IV ventriculo, aracnoidea (activa)	0.023	X	X
22083	Hidrocefalia por NCC / NCC ventricular	0.062	X	X
22084	Hidrocefalia por NCC / subaracnoidea y parenquimatosa	0.003	X	
22089	NCC activa subaracnoidea y parenquimatosa / hidrocefalia	0.904	X	X
22143	Epilepsia tardía secundaria a NCC / NCC mixta	0.021	X	X
22305	Crisis complejas tónico clónicas generalizadas por NCC subaracnoidea	0.025	X	X

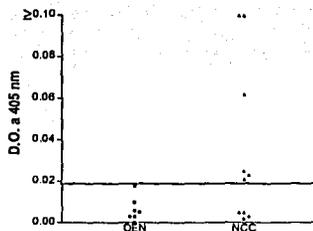


Figura 15. Gráfico de resultados del ELISA con LCR usando GL-1 como antígeno. OEN: otras enfermedades neurológicas, NCC: pacientes con neurocisticercosis.

Finalmente, se emplearon sueros de cerdo para comprobar su reactividad hacia el lípido purificado GL 1. Se obtuvieron muestras de suero de cerdos infectados artificialmente en granjas por inoculación de cisticercos, y sueros de cerdos sin cisticercosis comprobada por inspección del animal sacrificado. El ensayo se realizó con cinco sueros positivos (cerdos cisticercosos) y seis sueros negativos (cerdos no infectados de granjas). Los resultados, al igual que con sueros humanos, tampoco mostraron un reconocimiento específico del lípido aislado.

8. DISCUSIÓN

El estudio de glicolípidos en especies de parásitos ha tomado importancia debido a investigaciones que sugieren un papel importante de estos compuestos en la regulación del sistema inmune. Debido a la complejidad de este tipo de moléculas los efectos de sus componentes se estudian con frecuencia individualmente, parte lipídica y sacarídica se relacionan con eventos por separado en eventos celulares, lo cual a su vez refleja la complejidad de la respuesta inmune que podría inducirse en un hospedero del parásito. En México varios estudios se enfocan al diagnóstico rápido de cisticercosis por técnicas cada vez más accesibles, y al reconocimiento de los estudios interfase hospedero-parásito.

La pared celular del cisticerco contiene una fracción importante de compuestos glicosilados, que en conjunto se denominan glicocálix y permanecen sin un estudio profundo de su papel en la patogénesis de la cisticercosis. Los compuestos que constituyen el glicocálix del cisticerco tienen la función de servir de interfase hospedero-parásito y por lo mismo no sería circunstancial encontrar que realicen diversas funciones en el cisticerco. Aparentemente, estos compuestos se encuentran en recambio constante. Estas moléculas no se hallan unidas covalentemente a la estructura del cisticerco, por lo que pueden liberarse y es por esto que se sospecha del posible reconocimiento inmune de estos compuestos (junto con glicoproteínas) en sus hospederos. La presencia de compuestos glicolípidicos, específicamente, se ha asociado últimamente con eventos bioquímicos muy importantes en las células, entre los cuales se han encontrado efectos sobre la inducción de apoptosis (ceramidas) y modificaciones en la citocinesis (galactosilceramida).²⁸⁻³²

En el presente estudio se investigó la composición y el valor como reactivos de inmunodiagnóstico de los glicolípidos del cisticerco de *Taenia solium*.

Este trabajo permitió definir mejor las clases de glicolípidos sintetizados por el cisticerco de *Taenia solium*. Nuestros análisis revelaron la presencia de al menos tres grupos de lípidos, uno de ellos glicosilado y estable al álcali, el segundo glicosilado e inestable al álcali y el restante fosforilado, por lo que los compuestos encontrados se clasifican como glicosfingolípidos, glicolípidos con enlaces éster y fosfolípidos. El glicolípidos más abundante se constituye de una familia de homólogos con galactosa como único azúcar. Además, en fracciones semipurificadas del extracto etanólico del cisticerco, pueden distinguirse hasta 8 especies de glicolípidos que varían en polaridad por corrimiento en cromatografía en capa fina.

Algunos estudios ya han revelado la presencia de galactosas como un carbohidrato abundante en la superficie del cisticerco⁴⁰, principalmente en estudios donde se han estudiado proteínas de superficie del cisticerco, en donde se han empleado técnicas de revelado por medio de lectinas, las cuales unen específicamente a las porciones sacarídicas de glicoproteínas.

De acuerdo con los estudios realizados anteriormente en otras especies de céstodos encontrados en la literatura, el porcentaje de lípidos va desde el 8% hasta el 21%, por lo que el hallazgo de un 13% encontrado para *Taenia solium* se halla dentro de lo esperado para esta especie. Por otro lado, en cuanto al porcentaje por tipo de lípidos de *Taenia solium*, los lípidos encontrados más abundantes son los glicolípidos neutrales que han sido reportados entre un 27 % a 64% en otras especies de céstodos. Puede demostrarse que

existe una gran cantidad de lípidos neutrales o grasas en los extractos y éstos son los mayoritarios. Entre éstos pueden encontrarse grasas que incluyan colesterol y triglicéridos.²⁰⁻²⁴ También encontramos que los glicolípidos más abundantes son los glicosfingolípidos. La abundancia de la fracción del GL I hace suponer que juega un papel importante en la bioquímica del cisticerco, aunque también se encontraron cantidades importantes de fosfolípidos y otros glicolípidos.

Existen otros modelos de céstodos en los cuales se ha desarrollado investigación acerca de este tipo de compuestos, principalmente *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* y *Taenia crassiceps*. En estos céstodos la fracción esfingolípídica muestra reconocimiento por parte de sueros de animales infectados con los parásitos, y se reporta una reactividad cruzada entre algunos de ellos. La presencia de este tipo de compuestos en general se ha descrito también en otras especies: *Leishmania* presenta gran cantidad de glicolípidos en su superficie y se ha encontrado que la variación antigénica entre distintos estadios de su desarrollo es debida a la presencia de varias clases de lípidos; para *Plasmodium* y *Trypanosoma* se ha encontrado la participación de glicofosfatidilinosítoles, moléculas omnipresentes en las células, que desempeñan papeles importantes en la transducción de señales; en *Onchocerca volvulus* además se reconoce la reacción cruzada de sueros humanos que dan glicolípidos zwitteriónicos con otros nemátodos, lo que dificulta su comprensión para el diagnóstico pero fortalece la teoría de su papel importante en el transcurso de las distintas patologías que los involucran en enfermedades por parásitos extracelulares.^{39,41-43} De acuerdo con estos resultados, las actividades biológicas de los glicolípidos van desde la inmunosupresión específica de células de la respuesta inmune, señalización celular (transducción de señales), desarrollo y hasta muerte celular

programada. Por otro lado, queda por determinarse la participación de los glicolípidos aquí estudiados en efectos biológicos derivados de la interacción hospedero-parásito. En este aspecto, el estudio estructural de este trabajo sobre el GL 1 será de gran relevancia. Empleando técnicas de cromatografía en capa fina, en columna, en capa fina preparativa y en cartuchos precargados de sílica se logró aislar compuestos lipídicos; el más apolar y mayoritario fue analizado más profundamente en cuanto a su estructura química, encontrándose que contenía galactosa, esfinganina y cadenas lipídicas de 16 a 26 carbonos. La estructura elucidada para este compuesto coincide con moléculas comunes en este tipo de parásitos y ampliamente distribuida entre otras especies de parásitos. Estudios basados en la composición lipídica en distintas fases del desarrollo de céstodos además arrojan resultados que muestran variaciones altas que existen de estas moléculas durante varias fases del mismo, por lo que sería interesante estudiar dichas variaciones en Taenia solium. El compuesto GL 2, más polar y con más glicosilaciones posee características estructurales más específicas entre organismos patógenos.

Estudios basados en la composición lipídica en distintas fases del desarrollo de céstodos además arrojan resultados que muestran variaciones altas que existen de estas moléculas durante varias fases del mismo, por lo que sería interesante estudiar dichas variaciones en Taenia solium.

Por último, debido a que los glicosfingolípidos han sido propuestos como valiosos reactivos de diagnóstico en otras parasitosis, como las producidas por *Trypanosoma* y *Echinococcus*, las fracciones GL1 y GL2 fueron evaluadas como antígenos para el diagnóstico de neurocisticercosis por ELISA. Al probar los compuestos aislados con sueros y líquidos cefalorraquídeos de pacientes con neurocisticercosis en ensayos preliminares, se encontró

una *sensibilidad pobre*, sin embargo, sería de interés investigar el valor de estos compuestos como elementos de cocteles de antígenos para inmunodiagnóstico. Estos resultados pueden derivarse de la selección de sueros normalmente realizada para los estudios de diagnóstico. Estudios con un mayor número de muestras pueden arrojar resultados distintos. Es importante destacar algunos puntos en cuanto al inmunodiagnóstico de *Taenia solium*: 1) los mejores resultados hasta ahora obtenidos para el inmunodiagnóstico se derivan de fracciones proteicas (incluyendo polipéptidos obtenidos por técnicas de biología molecular) y en especial glicoproteicas (que han brindado una mayor especificidad) 2) los extractos más utilizados son fracciones totales o semipurificadas del cisticerco 3) aunque los antígenos proteicos han sido probados con buenos resultados para el diagnóstico de la neurocisticercosis, recientemente se han obtenido resultados de estudios realizados en poblaciones más amplias y heterogéneas que reportan la pobre efectividad de estos mismos antígenos dando lugar a resultados contradictorios.

En el modelo de *Taenia crassiceps*, se ha reportado que los sueros de neurocisticercosis reconocen moléculas lipídicas de la tenia del ratón. Aunque *Taenia solium* comparte algunas fracciones lipídicas con *Taenia crassiceps* nosotros no hemos encontrado un reconocimiento antigénico específico de los lípidos de *Taenia solium* por sueros humanos. Nuestros resultados muestran que el reconocimiento de lípidos de *Taenia solium* en humanos solamente es específico en LCR, pero no en suero.

Por otro lado, se han tratado de desarrollar técnicas de inmunodiagnóstico por medio de ELISA ya que es un procedimiento más sencillo y barato que la inmunoelectrotransferencia, que aunque ha demostrado mayor efectividad en la detección

de ciertas enfermedades, también son alrededor de tres veces más costosos, requieren de una mayor capacidad técnica y equipos menos accesibles que dificultan su uso cotidiano o generalizado para el tratamiento de muestras, especialmente en México. La cisticercosis continúa siendo un gran problema de salud pública en México y un monitoreo en la población por técnicas de este tipo favorecería un mayor entendimiento de los factores que caracterizan a la patogénesis de la neurocisticercosis.

9. CONCLUSIONES

- Empleando técnicas de cromatografía se logró aislar compuestos lipídicos de Taenia solium. Los análisis realizados revelaron la presencia de glicosfingolípidos, glicolípidos y fosfolípidos.
- El glicolípido más abundante, se constituye de una familia de homólogos con galactosa como único azúcar, conformado de esfingosina y cadenas lipídicas de 16 a 26 carbonos. La estructura dilucidada para este compuesto, coincide con moléculas comunes en este tipo de parásitos y ampliamente distribuida entre otras especies de parásitos.
- Al probar los compuestos aislados con líquidos cefalorraquídeos de pacientes con neurocisticercosis por ELISA, se encontró una sensibilidad pobre, sin embargo, para el GL 1 los ensayos mostraron una sensibilidad del 54.5%, con una especificidad del 100%. Por lo tanto, sería de interés investigar el valor de este compuesto como elemento de mezclas de antígenos para inmunodiagnóstico.

10. PROPUESTAS Y PERSPECTIVAS

Investigar los efectos sobre células específicas del sistema inmune de los compuestos purificados (como moléculas completas y como residuos) puede rendir en un mejor conocimiento de la enfermedad y así de su prevención y tratamiento.

El análisis estructural de los compuestos GL 2 y GL 3 y análisis químico de los compuestos de menor abundancia (fosfolípidos, glicolípidos más polares) puede rendir en un mejor conocimiento de su papel en la patogénesis de la cisticercosis.

Emplear un mayor número de muestras en los inmunoensayos y probar distintas mezclas de antígenos, que a su vez pueden ayudar a mejores estudios epidemiológicos que aporten datos acerca de la patogénesis de la enfermedad, ya que la cisticercosis es una enfermedad compleja.

El estudio de estos compuestos y otras moléculas relacionadas por efecto sinérgico en otros parásitos ayudaría a comprender el mecanismo de las especies de invasión del hospedero y su interacción con el sistema inmune.

11. REFERENCIAS

1. Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. Sal Pub Mex 1997; 39(3): 225-231.
2. Flisser A, F Malagon. Cisticercosis humana y porcina. México: Limusa; 1989.
3. White CA. Neurocysticercosis: A major cause of neurological disease worldwide. Clin Inf Dis 1997; 24: 101-15.
4. Tsang VCW, Wilson M. *Taenia solium* cysticercosis: an under-recognized but serious public health problem. Parasitol Today 1995; 11(3): 124-6.
5. Boletín de Epidemiología. Teniosis y cisticercosis. No. 43 Vol. 13 Semana 43. 20-6 de octubre de 1996.
6. Del Brutto, S. Neurocysticercosis: an update. Rev. Infect. Dis. 1988; 10:1075.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SSA2-1994 para la vigilancia, prevención y control del complejo teniosis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica.
8. Publicación Técnica del INDRE No 4, Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*: Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos, Dirección General de Epidemiología, 1991, México, D. F.
9. Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Malagon Cisticercosis humana. México: Manual Moderno. 1997.
10. Robles C. Tratamiento de la neurocisticercosis. México: Facultad de Medicina, UNAM. 1997.

11. Salinas P, Sandoval L, Rugiero E, Contreras MC. Diagnóstico de la neurocisticercosis humana mediante ELISA-IgG usando un antígeno purificado. *Bol Chil Parasitol* 1996; 51: 85-90.
12. Larralde C et al. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Sal Pub Mex* 1992; 34(2): 197-210.
13. Mondragón A, Plancarte A, Flisser A. El diagnóstico de la cisticercosis humana por ELISA. *Sal Pub Mex* 1993; 36(4): 393-8.
14. Ramos-Kuri , Montoya RM, Padilla A, Govesensky T, Díaz ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis: dissapointing performance of serology (ELISA) in an unbiased sample of neurological patients. *Arch Virol* 1992; 49: 633-6.
15. Del Brutto OH, Rajshekhar V, White AC Jr., Tsang VC, Nash TE, Takayanagui OM, Scahntz PM, Evans CA, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan JC, Sarti E, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH. Proposed dignostic criteria for neurocyticerccosis. *Neurology* 2001 Jul 24; 57(2)177-83.
16. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1998; 84(1): 74-81.
17. Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM, Teale JM. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *J Immunol* 1999, 162(2):995-1002.
18. Warren KS. Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. 3a. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1993. p. 438-71.

19. Cysticercosis. En Kenneth WW, Schantz P. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Vol I. Orlando: Academic Press; 1986. p. 109-59.
20. Kunz J, Baumeister S, Dennis RD, Kuytz B, Wiegandt H, Geyer E. Comparative serological reactivity of *Taenia crassiceps*, *Taenia solium* and *Taenia saginata* metacestode neutral glycolipids to infection serum from *Taenia crassiceps* infected mice. Mol Biochem Parasitol 1992; 53:53-62.
21. Kunz J, Baumeister S, Dennis RD, Kuytz B, Wiegandt H, Geyer E. Immunological recognition of larval *Taenia crassiceps* glycolipids by sera from parasite-infected mice. Parasitol Res 1991; 77:443-7.
22. Geyer R, Baumeister S, Dennis RD, Peter-Katalinic J, Wiegandt H, Geyer E, Hartmann R. Glycosphingolipids in cestodes: Chemical structure of ceramide monosaccharide, disaccharide, trisaccharide and tetrasaccharide from metacestodes of the fox tapeworm, *Taenia crassiceps* (Cestoda: Cyclophyllidae). Eur J Biochem 1992 ; 207, 1053-62.
23. Mills GL, Taylor DC, Williams JF. Lipid composition of metacestodes of *Taenia taeniaeformis* and lipid changes during growth. Mol Biochem Parasitol 1981; 3:301-18.
24. Mills GL, Taylor DC, Williams JF. Lipid composition of the helminth parasite *Taenia crassiceps*. Comp Biochem Physiol 1981; 69B:553-7.
25. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. USA: 2a. edición. 1993.
26. Makita A, Taniguchi N. Glycosphingolipids. 1985. Glycolipids 1-19.
27. Morrison IM. Glycolipids. En: Chaplin MF, Kennedy JF. (Eds) Carbohydrate analysis. A practical approach. Oxford, England: IRL Press Limited; 1987.

28. Sphingolipids: metabolism and cell signalling *En* Vance, DE, Vance J. E. (Eds.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 1996: Elsevier Science. Cap. 12, 309-329.
29. Fuks Z y Kolesnick R. Ceramide: A signal for apoptosis or mitogenesis?. *J Exp Med* 1995; 194: 9-52.
30. Hakomori S. Byfunctionalrole of glycosphingolipids; modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 1990; 265(31) 18713-6.
31. Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 1994; 269(5): 3125-8.
32. Hannun YA, Obeid L. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *TIBS* 1995; 20: 73- 7.
33. Willard HH, Merritt LL, Dean JA, Settle FA. Métodos instrumentales de análisis. México: Grupo Editorial Iberoamérica. 1991
34. Schnaar R. Isolation of glycosphingolipids. 1994. *Methods in Enzimology* 230: 348-389.
35. Taky T, Kasama T, Handa S, Ishikawa D. A simple and quantitative purification of glycosphingolipids and phospholipids by Thin-Layer Chromatograph blotting. *Anal Biochem* 1994; 223: 232-8.
36. Blakeney AB, Stone BA. (Methylation of carbohydrates with lithium methylsulphonyl carbanion. *Carbohydr Res* 1985, 140: 319-24.
37. Sweeley, C C, Bentley R, Makita M & Wells WW. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2497-507.

38. Ito A. Basic and applied immunology in cestode infections: from *Hymenolepis* to *Taenia* and *Echinococcus*. *Int J Parasitol* 1997; 1203-11.
39. Villa Boas MH, Da Silva MC, De Oliveira TG, Travassos LR, Bergter EB. Reactivity of chagasic sera with crude and highly purified glycosphingolipid fractions from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 260-6.
40. Restrepo BI, Obregon-Henao A, Mesa M, Gil DL, Ortiz BL, Mejia JS, Villota GE, Sanzón F, Teale JM. Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *Int J Parasitol* 2000; 30(6):689-96.
41. Baumeister S, Irmer G, Dennis R, Gasser RB, Geyer E. Chromatographic and antigenic properties of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst-derived glycolipids. *Parasite Immunol* 1993; 15: 669-81.
42. Persat F, et al. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferative response glycosphingolipids from metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. *Inf Immun* 1996; 64(9): 3682-7.
43. Piedrafita D; Proudfoot L; Nikolaev, V. A. et al. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur J Immunol* 1999; 29: 235-44.
44. Truitt RL, Hanke C, Radke J, Mueller R, Barbieri J. Glycosphingolipids as novel targets for T-cell suppression by the B subunit of recombinant heat-labile enterotoxin. *Inf Immun* 1998; 66(4): 1299-308.
45. Friedland JS et al. Elevated concentrations of Eotaxin and Interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun* 1998; 66(9): 4522-5.
46. Laboratory centre for disease control material safety data sheet - infectious substances
Date prepared: September, 1996 Prepared by: Office of Biosafety LCDC.

47. Wilks D, Farrington M, Rubenstein D. The Infectious Diseases Manual. Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1997. p. 117-24.
48. Baumeister S, Schuh C, Dennis R, Walther M, Pfister K, Geyer E. Bovine cysticercosis: demonstration in experimentally infected calves of serum IgG antibodies reactive with neutral glycolipids of *Taenia saginata* and *Taenia crassiceps* metacestodes. Parasitol Res 1995; 81: 18-25.