

03062 16
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH

**Clonación y caracterización de genes que
codifican para glicoproteínas de superficie
de *Taenia solium*.**

TESIS

que para obtener el grado de
Maestra en Investigación Biomédica Básica
P R E S E N T A:

Dayana Desirée Rodríguez Contreras

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Juan Pedro Laclette.

Lista de abreviaturas

α	Anti
AgB	Antígeno B o paramiosina de <i>T. solium</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
Con A	Concanavalina A
EC	Extracto crudo
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FGp	Fracción de glicoproteínas
GLUTs	Facilitadores de glucosa humanos (ej. GLUT1)
Gp(s)	Glicoproteína(s)
GTP(s)	Proteína(s) transportadora(s) de glucosa
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol con sales de sodio
pfl	Placas formadoras de lisis
PM	Pesos moleculares
PMSF	Fenilmetil-sulfonil fluoruro
PVDF	Difluoruro de polivilideno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SGTPs	Facilitadores de glucosa de <i>S. mansoni</i> (ej. SGTP1)
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Solución salina con citratos
TAE	Amortiguador de Tris-acetatos
TBE	Amortiguador de Tris-boratos
TGTPs	Facilitadores de glucosa de <i>T. solium</i> (ej. TGTP2)
TLCK	Nalfa-p-tosil-L-lisin clorometil cetona
TNT	Solución salina amortiguada con Tris
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-idolil- β -D-galactosido

Índice

I. Resumen	1
II. Introducción	2
1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	2
2. Descripción o morfología del cisticerco	4
3. El glicocáliz del tegumento	6
4. Relación huésped-parásito en la interfase	7
5. Antecedentes	11
6. Objetivo	14
III. Materiales y métodos	
1. Materiales biológicos	15
2. Métodos inmunológicos	
A. Preparación del extracto crudo (EC)	16
B. Obtención de la fracción enriquecida en glicoproteínas (FGp)	16
C. Cuantificación de proteínas	16
D. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)	17
E. Purificación de las Gps	17
F. Secuencia de aminoácidos	17
G. Electrotransferencia de proteínas	17
i) Reconocimiento de proteínas por anticuerpos	19
ii) Reconocimiento de las Gps por Con A	19
iii) Tratamiento con metaperiodato	19
3. Métodos de biología molecular	
A. Titulación de las bibliotecas	20
B. Búsqueda de clonas en la biblioteca de λ gt11	
i) PreadSORCIÓN de los anticuerpos α -Gp1	20
ii) Tamizaje de la biblioteca con anticuerpos	21
C. Búsqueda de clonas en la biblioteca de λ gt10	
i) Obtención de las sondas	22
ii) Marcaje radioactivo de las sondas	23
iii) Tamizaje de la biblioteca de λ gt10	23
D. Amplificación del DNA por PCR	24

E. Secuenciación directa de fragmentos obtenidos por PCR	25
F. Subclonación en el vector M13	
i) Ligación de las clonas al vector	25
ii) Transformación bacteriana	25
iii) Identificación y análisis de recombinantes	25
iv) Purificación del DNA de cadena sencilla a partir de las partículas virales	25
v) Secuenciación del DNA	26
G. Análisis de las secuencias	26
IV. Resultados	27
1. Caracterización de Gps del cisticerco	27
2. Clonación de Gps	
A. Purificación de Gps	29
B. Intentos de clonación usando anticuerpos α -Gps	32
C. Clonación de GTPs	36
V. Discusión	53
VI. Apéndice	58
VII. Bibliografía	62

I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue contribuir a la caracterización molecular de las glicoproteínas que se encuentran en la superficie tegumental del cisticerco de *T. solium*. Se intentó el aislamiento de clonas de cDNA de estas proteínas por varias estrategias, inicialmente se usaron sondas de DNA diseñadas a partir de secuencias parciales de una proteína purificada. Otra estrategia fue la utilización de anticuerpos dirigidos contra glicoproteínas de superficie. La estrategia que resultó productiva fue la búsqueda de proteínas de superficie aprovechando la similitud en su secuencia de aminoácidos con proteínas homólogas. Esta estrategia permitió el aislamiento de clonas que contienen la secuencia codificadora completa de una proteína con características de transportador de glucosa. Los transportadores de glucosa son glicoproteínas integrales de membrana que se encuentran en prácticamente todos los organismos. Una de las clonas contiene un inserto de 1,723 pb con un marco abierto de lectura de 1,500 pb. La secuencia de aminoácidos deducida corresponde a una proteína de 500 aminoácidos con un peso molecular de 54.5 kDa. Los análisis hidropáticos demuestran que se trata de una proteína con los 12 segmentos de α -hélices que atraviesan la membrana plasmática característicos de los transportadores de glucosa. Esta proteína fue designada TGTP2 dada su gran similitud con uno de los transportadores de *S. mansoni* (SGTP2). Interesantemente, la secuencia de aminoácidos de TGTP2 carece del sitio de N-glicosilación en la primera asa externa a partir del amino terminal, presente en la mayoría de los transportadores de eucariotes conocidos. Estas clonas abren la posibilidad de estudiar en detalle el manejo de glucosa del cisticerco.

II. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una parasitosis causada por la forma larvaria o cisticerco de un platihelminto céstodo llamado *Taenia solium*, que afecta al hombre y al cerdo. Esta enfermedad es de alta prevalencia en países subdesarrollados, siendo la principal causa de problemas neurológicos de origen parasitario en México. Las personas afectadas pueden desarrollar convulsiones, hidrocefaleas o experimentar otros desórdenes del SNC que los pueden llevar a la muerte. Además, la economía de estos países se ve afectada no solo por la disminución en la actividad productiva de las personas infectadas y por los elevados gastos que se producen por concepto de hospitalización y tratamiento, sino por las pérdidas económicas que se producen en la porcicultura (Flisser et al., 1991; Tsang y Wilson, 1995).

1. CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*.

La *T. solium* tiene un ciclo de vida que involucra dos huéspedes: el cerdo como huésped intermediario alberga la forma larvaria o cisticerco, mientras que el hombre es el único huésped del parásito adulto. Aunque no participa en el mantenimiento del ciclo de vida, el hombre también puede adquirir la cisticercosis al actuar como huésped de la larva lo que convierte a esta parasitosis en un grave problema de salud pública.

La cisticercosis es adquirida por el huésped intermediario al ingerir los huevecillos de *T. solium* presentes en heces y alimentos contaminados. En el tubo digestivo del huésped la acción de las enzimas proteolíticas y de las sales biliares destruyen las envolturas protectoras dejando libre al embrión hexacanto (Laclette et al., 1982). El embrión penetra la mucosa intestinal, ayudado de sus ganchos y secreciones líticas, hasta alcanzar vasos linfáticos y sanguíneos que lo distribuyen a una

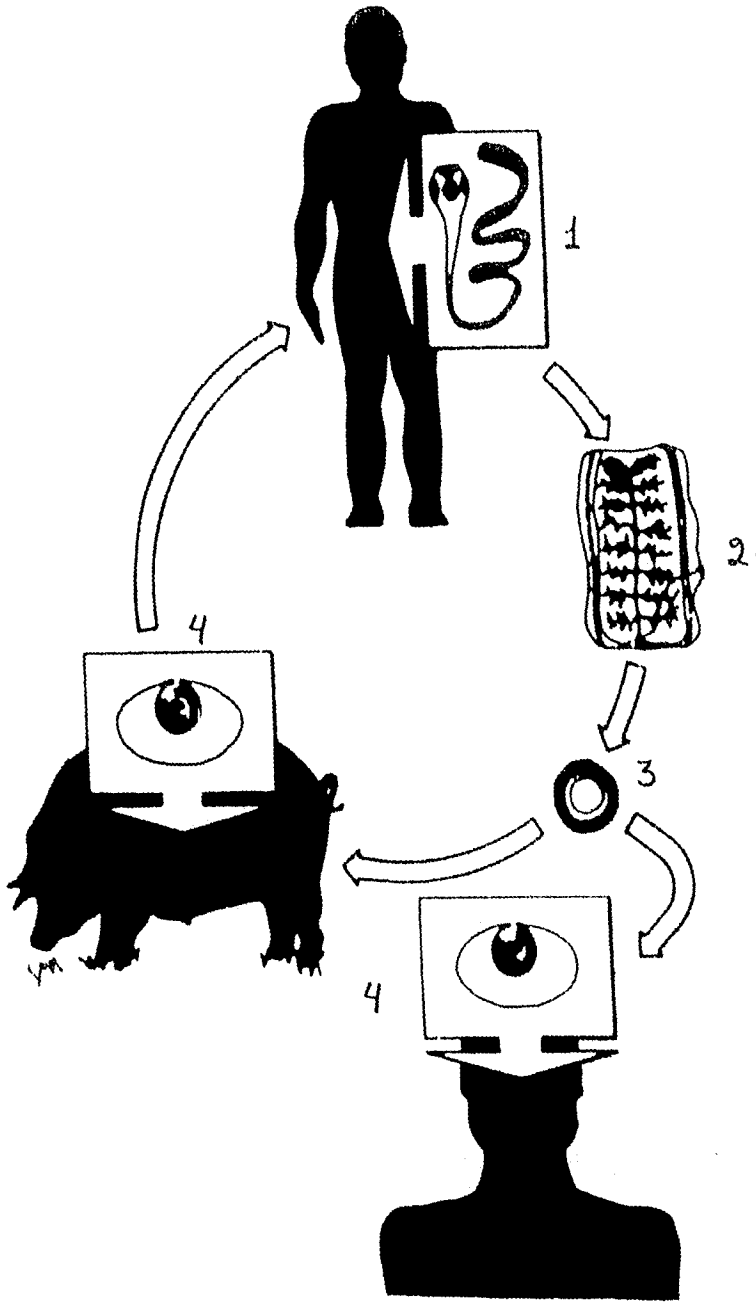


Fig.1. Ciclo de vida de *T. Solium*. 1. parásito adulto; 2. proglótido grávido; 3. huevecillo; 4 y 5: cisticercos (tomado de Aluja et al., 1987).

variedad de órganos y tejidos (músculo esquelético, miocardio, sistema nervioso, ojos, tejido subcutáneo, entre otros) donde se desarrolla hasta convertirse en una larva o cisticerco.

El ciclo se completa cuando el humano come carne de cerdo cruda o mal cocida, infectada con cisticercos viables. Nuevamente, la acción de las enzimas proteolíticas y de las sales biliares del aparato digestivo activan al cisticerco e inducen la evaginación o salida del escólex de su vesícula protectora. Una vez evaginado, el escólex se fija a la mucosa intestinal donde crece y se diferencia en un parásito adulto. El gusano adulto desprende los proglótidos grávidos que salen al exterior con las heces. Éstos se desintegran en el medio ambiente liberando los huevos que pueden alcanzar al huésped intermediario por distintos medios (Aluja et al., 1987).

2. DESCRIPCIÓN O MORFOLOGÍA DEL CISTICERCO.

El cisticerco es una vesícula translúcida redonda u ovoide de 0.5 a 2 cm de diámetro con un escólex invaginado y opaco que posee cuatro ventosas y un rostelo con una doble cadena de ganchos. La vesícula está llena de un fluido transparente llamado fluido vesicular, que contiene proteínas del parásito y del huésped (Willms et al., 1982).

La superficie de la pared vesicular está formada por el tegumento, un citoplasma sincicial, anucleado y continuo que en su cara externa se encuentra aumentado por proyecciones digitiformes llamadas microtricas 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 procesos citoplasmáticos que comunican al tegumento con cuerpos celulares nucleados llamados citones tegumentales. Estos citones contienen numerosas vesículas, retículo endoplásmico bien desarrollado, aparato de

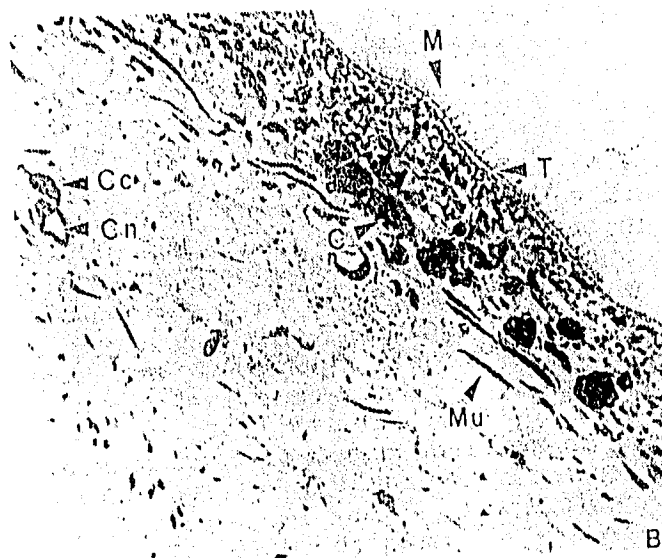
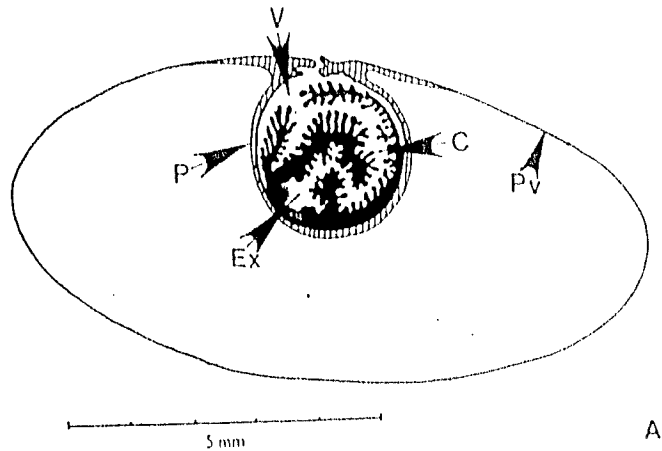


Fig. 2. Morfología del cisticerco de *T. solium*. A: Ilustración esquemática de la larva entera. B: micrografía óptica de un corte de la pared vesicular. C: canal espiral, Cc: células formadoras de canal, Cn: canal, Ex: escólex, M: microvellosidades, Mu: músculo, P: pared vestibular, Pv: pared vesicular, Tg: tegumento y V: espacio vesicular.

golgi, ribosomas y abundantes mitocondrias. Por debajo de la membrana basal se observan varias capas de músculo liso, abundantes depósitos de glucógeno y grasa, así como un complejo sistema de canales con función protonefridial entre otras estructuras (Lumsden et al., 1982).

3. EL GLICOCÁLIX DEL TEGUMENTO

El tegumento del cisticerco de *T. solium* está revestido externamente por una cubierta de macromoléculas ricas en carbohidratos llamada glicocáliz (Sosa et al., 1977). La presencia de carbohidratos en la superficie de los céstodos ha ~~siempre~~ ~~demostrada~~ por microscopía electrónica usando diversas tinciones (Trimble y Lumsden, 1975; Willms et al., 1982). Estudios de localización usando diferentes lectinas marcadas mostraron que concanavalina A (Con A) se une preferencialmente a la superficie de los metacéstodos sugiriendo que la mayor parte de los carbohidratos expuestos son D-manósidos y/o D-glucósidos (Sandeman y Williams, 1984; Trimble y Lumsden, 1975; Knowles y Oaks, 1979; Schmidt y Peters, 1987). La composición y distribución de estos carbohidratos en la superficie del cisticerco es relativamente homogénea (Mills et al., 1984; Sandeman y Williams, 1984; Landa, 1988; Lamsam y McManus, 1990). Los glicanos que forman parte del glicocáliz son ensamblados en el citoplasma de los citones y transportados al tegumento por vesículas que se fusionan con la membrana plasmática (Trimble y Lumsden, 1975; Ramírez-Bon et al., 1982).

El glicocáliz de los metacéstodos está formado por glicoproteínas y glicolípidos con numerosos grupos ácidos que dan a la membrana una carga neta electronegativa en la superficie (Lumsden, 1972; Trimble y Lumsden, 1975; Willms et al., 1980; Mills et al., 1984). Evidencias de microscopía electrónica sobre la superficie de los céstodos sugieren que parte de este rico

glicocáliz son componentes integrales de membrana (Lumsden et al., 1970; Lumsden, 1975).

El glicocáliz muestra una serie de propiedades que permiten asociarlo con diversas actividades. Hay evidencias de que los grupos ácidos del glicocáliz proveen sitios de unión para varios electrolitos en céstodos adultos entéricos (Lumsden et al., 1970). La habilidad del glicocáliz de concentrar cationes puede jugar un papel importante en la activación de ciertas enzimas de la superficie parasitaria. Además, el parásito parece conservar la carga electronegativa de su superficie a través de un recambio continuo de los componentes del glicocáliz tal vez para evadir el ataque enzimático e inmunológico del huésped (Oaks y Lumsden, 1971; Trimble y Lumsden, 1975).

Los componentes del glicocáliz de los metacéstodos, y en especial las proteínas, se han involucrado en funciones importantes tanto para el parásito como para la relación que establece con su huésped. Algunas proteínas aparentemente están involucradas en fenómenos de transporte de solutos, otras tienen actividades enzimáticas y otras pudieran estar involucradas en la protección del parásito contra su huésped (Pappas y Read, 1975; White et al., 1992; Hustead y Williams, 1977; Hammerberg et al., 1980). Además, las glicoproteínas son generalmente muy inmunogénicas, por lo que han sido usadas en el desarrollo de pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la parasitosis producida por el cisticerco de *T. solium* (Grogl et al., 1985; Tsang et al., 1989; Feldman et al., 1990).

4. RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO EN LA INTERFASE.

La interfase huésped-parásito es la región de contacto físico y químico entre ambos organismos. El tegumento es la estructura parasitaria que interactúa directamente con el huésped por lo que muchas de las funciones son llevadas a cabo por este órgano (Willms et al., 1982). Dado que los céstodos carecen de

tubo digestivo, el tegumento de estos parásitos no solo sirve de protección, siendo resistente a la acción de enzimas proteolíticas y a la respuesta inmune del huésped sino que también esto hace al tegumento una superficie metabólicamente activa a través de la cual las secreciones pueden ser transportadas, los nutrientes absorbidos y el material de desecho eliminado (Pappas y Read, 1975; Lumsden, 1975).

El cisticerco puede permanecer en los tejidos del huésped por períodos prolongados de hasta varios años lo que indica una buena coexistencia entre ambos organismos (Laclette et al., 1989). Alrededor de los cisticercos, el huésped desarrolla una reacción inflamatoria de variable intensidad que puede ir desde muy moderada, con escaso infiltrado celular alrededor de parásitos viables, hasta muy intensa alrededor de parásitos semidestruidos (Willms et al., 1980; Aluja et al., 1988; Escobar-Izquierdo, 1988). Las características del infiltrado celular y la degeneración del parásito en el tejido muscular de cerdos infectados han llevado a clasificar la reacción inflamatoria en siete grados de intensidad (Aluja et al., 1988). Cabe hacer notar que los primeros grados de reacción son los que se observan alrededor de cisticercos viables. Con algunas diferencias, algo similar a sido observado en el parénquima cerebral de pacientes con neurocisticercosis (Escobar-Izquierdo, 1988). Al principio se observan grupos de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos localizados principalmente en frente de la entrada al canal espiral. Este infiltrado celular aumenta en extensión y se acompaña con la aparición de algunos macrófagos. En esta etapa los parásitos se encuentran viables y sin cambios morfológicos correspondiendo a los tres primeros grados descritos por Aluja et al. (1988), y representa un 47-65% de los cisticercos en un cerdo infectado. En etapas subsecuentes, tanto el parásito como la reacción inflamatoria sufren modificaciones. Se observa la formación de una reacción de tipo granulomatosa de variable intensidad alrededor de la lesión, produciéndose ligeros cambios degenerativos en la superficie del tegumento. Aumenta la cantidad

de macrófagos y se observa la formación de agregados de linfocitos y muchos eosinófilos degranulados. En un grado más avanzado, la reacción inflamatoria es más intensa observándose degeneración en el tegumento y cambios necróticos en los citones tegumentales. Los agregados de linfocitos son de mayor tamaño y se observan células gigantes y numerosos fibroblastos. El número de eosinófilos disminuye observándose necrosados muchos de ellos. En la etapa final, el parásito está completamente degenerado. El número de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos disminuye notablemente en la zona granulomatosa; en cambio, se observan gran cantidad de fibroblastos, fibrocitos y células gigantes. Posteriormente, el lugar que ocupaba el parásito está totalmente invadido por tejido fibroso y las células inflamatorias son muy escasas.

En la neurocisticercosis humana, la intensidad de la respuesta por parte del huésped depende de la localización del parásito. Los cisticercos localizados en el parénquima cerebral sobreviven muchos años sin desencadenar una respuesta inflamatoria considerable (Rabiela et al., 1982; Escobar-Tzquierdo, 1988).

En varios modelos de cisticercosis animal se ha demostrado la presencia de una respuesta inmune concomitante. Por ejemplo, la infección de ratas con metacéstodos de *T. taeniaeformis* induce una resistencia pronunciada a la reinfección (Rickard y Williams, 1982). Aparentemente, el huésped infectado es capaz de rechazar una nueva infección, pero incapaz de destruir a los cisticercos ya establecidos. En el caso de la cisticercosis porcina, los cisticercos de un mismo cerdo son bastante homogéneos, sugiriéndose que todos fueron adquiridos en una misma infección (Correa et al., 1987). Esto indica que el parásito establecido posee mecanismos de evasión de la respuesta inmune que le permiten sobrevivir por largos períodos en huéspedes inmunocompetentes. Se ha hablado de una modulación de la respuesta inmune. En este respecto, se ha observado una inhibición en la proliferación de linfocitos en respuesta a

mitógenos en humanos y cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* (Willms et al., 1982; Correa et al., 1989; Molinari et al., 1990, Molinari et al., 1993; Tato et al., 1995) y en ratones infectados experimentalmente por *T. crassiceps* (Sciutto et al., 1995). Además, se ha observado un retardo en la cinética de proliferación de linfocitos en pacientes con neurocisticercosis (Herrera et al., 1994). En el metacéstodo de *T. taeniaeformis* se ha caracterizado un potente inhibidor de proteasas que inhibe la respuesta de linfocitos tanto a mitógenos como a antígenos específicos (Suquet et al., 1984; Leid et al., 1984).

El mantenimiento de la relación huésped-parásito en varios ejemplos de cisticercosis involucra en parte la habilidad del parásito para impedir el aumento de la reacción inflamatoria. Al respecto, se ha descrito un antígeno denominado como "B" (AgB) de cisticercos de *T. solium* que tiene la capacidad de inhibir la vía clásica del complemento a través de la inhibición de la función de C1q (Laclette et al., 1992). Puesto que el complemento juega un papel central en la modulación de la reacción inflamatoria, se ha sugerido que la secreción de AgB al inhibir la cascada del complemento en su paso inicial, disminuye la producción de mediadores complementarios de inflamación y contribuye a impedir el escalamiento de la reacción inflamatoria. El AgB podría no ser el único factor parasitario que contribuyera en esta dirección. La taeniaestatina de *T. taeniaeformis* puede inhibir el factor D de la vía alternativa del complemento (Leid, 1988). También se han caracterizado proteínas de secreción con la habilidad de inhibir la actividad de proteasas del huésped y la quimiotaxis de neutrófilos y eosinófilos (Suquet et al., 1984; Shepherd et al., 1991; Potter y Leid, 1986). Asimismo, se ha descrito la producción y/o secreción de proteínas con capacidad de degradar moléculas citotóxicas y de inhibir la cascada del complemento (Leid y Suquet, 1986; Landa, comunicación personal; Hammerberg et al., 1980; Leid, 1988). Además, se ha demostrado la presencia de inmunoglobulinas en la superficie de diversos metacéstodos (Willms y Arcos, 1977; Threadgold y Befus, 1977; Sogandares-

Bernal y Voges, 1978; Siebert et al., 1981). Estos hallazgos sugieren que la modulación de la respuesta inmune por los metacéstodos facilita la sobrevivencia del parásito.

5. ANTECEDENTES

Las características morfológicas y bioquímicas de la superficie externa de los parásitos determinan los términos en que se establece la interacción con sus huéspedes. Por lo tanto, la identificación y caracterización de los componentes moleculares que participan en el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco seguramente mejorará nuestra comprensión de los mecanismos subyacentes.

La superficie que los cisticercos le presentan a su huésped es el tegumento (ver I.2), cuya membrana plasmática externa presenta un rico glicocáliz con glicoproteínas y glicolípidos. Algunas de estas glicoproteínas han sido involucradas en funciones importantes para el parásito y para el mantenimiento de la relación con su huésped. Algunas proteínas de superficie han sido identificadas por su actividad enzimática. Por ejemplo, estudios histoquímicos han demostrado la presencia de fosfatasa en la superficie de muchos céstodos (Smyth, 1969). En *H. diminuta* se ha caracterizado parcialmente una proteína (104 kDa) con actividad de fosfatasa alcalina (Pappas, 1991). En *E. granulosus* la purificación de esta enzima permitió llevar a cabo estudios físicos y cinéticos (Sarciron et al., 1991). Otras enzimas identificadas, como las ATPasas, han sido utilizadas como marcadores de superficie (Knowles y Oaks, 1979). La caracterización del tegumento de *H. diminuta* reveló dos isoformas de ATPasas dependientes de Ca^{2+} (Hipkiss et al., 1987). En el cisticerco de *T. solium* se clonó una proteína, localizada en la membrana plasmática del parásito, con homología a las ATPasas de Na/k (Landa, comunicación personal). También, se ha descrito la actividad enzimática de metaloproteasas tanto en la membrana

plasmática como en el fluido vesicular de *E. granulosus* (Marco y Nieto, 1991). Esta actividad proteolítica también se observa en el cisticerco de *T. solium*, pero no se hace referencia a su posible localización (White et al., 1992). Se desconoce el papel específico que desempeñan estas proteínas en la superficie parasitaria, sin embargo, se considera que su presencia puede ser importante para la sobrevivencia del parásito.

La antigenicidad de algunas glicoproteínas de superficie en los ténidos ha permitido su caracterización. Como era de esperarse, una gran parte de los antígenos en la superficie de cisticercos de algunos ténidos resultaron ser glicoproteínas con afinidad hacia lectin-lectina (Parkhouse et al., 1987). La mayoría de las proteínas en la superficie de *T. crassiceps* resultaron inmunogénicas (Lamsan y McManus, 1990) y se han usado en el desarrollo de pruebas diagnósticas inmunológicas.

Algunas otras glicoproteínas de superficie participan en fenómenos de transporte de solutos relevantes para su mantenimiento en los tejidos del huésped (Pappas y Read, 1975; Smyth, 1969). Además, como se mencionó arriba, puesto que los cisticercos carecen de tubo digestivo, la totalidad de la toma de nutrientes se lleva a cabo a través de la superficie tegumental. Sobresale el hecho de que los cisticercos tienen requerimientos sustanciales de carbohidratos para llevar a cabo en forma óptima su desarrollo y reproducción (von Brand et al., 1964; Smyth, 1969). La glucosa es el principal monosacárido utilizado por estos parásitos, al igual que en muchos otros organismos. En otros parásitos céstodos como *Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *T. taeniaeformis*, etc, se ha descrito que el transporte de carbohidratos se lleva a cabo por un sistema saturable, sensible a cambios de pH, y que es inhibido por diversos agentes químicos. Todas estas propiedades indican que el transporte de carbohidratos en membrana tegumental es mediado por un sistema de acarreadores específicos. Se ha sugerido un sistema de transporte activo en los gusanos adultos ciclofilídeos y tetrafilídeos, similar al que llevan a cabo las células

intestinales de los mamíferos (Pappas y Read, 1975). Este tipo de transporte de nutrientes es muy favorable en el ambiente donde se desarrollan los gusanos adultos dado que las concentraciones de carbohidratos en el intestino son cambiantes. En contraste, los cisticercos viven en un ambiente donde las concentraciones de glucosa se mantienen relativamente constantes, por lo que sería de esperarse que una parte considerable del movimiento de azúcares sea llevado a cabo por transportadores/facilitadores. Recientemente, se ha demostrado la presencia de facilitadores de glucosa en el metacéstodo de *H. diminuta* (Rosen y Uglem, 1988). Sin embargo, no se ha aislado la(s) proteína(s) responsable(s).

En resumen, la composición de proteínas sobre la superficie tegumental de los metacéstodos ha sido investigada usando una combinación de métodos de marcaje radioactivo, inmunoprecipitación por anticuerpos y por afinidad a lectinas (Knowles y Oaks, 1979; Mills et al., 1984; Parkhouse et al., 1987; Lamsam y McManus, 1990; Leducq y Gabrion, 1992).

En nuestro laboratorio se han realizado estudios de caracterización de la superficie del cisticerco de *T. solium*. Se han purificado y caracterizado parcialmente algunas proteínas de superficie a partir de una fracción de tejido enriquecida en glicoproteínas, obtenida por cromatografía de afinidad a Con A (Landa et al., 1994). Con la excepción de la glicoproteína de 68 kDa (Gp4), todas las otras glicoproteínas resultaron inmunogénicas. Los anticuerpos producidos hacia las glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* reconocen componentes en la superficie de otras especies dentro de la familia *Taenidae*. La presencia de estas proteínas en la superficie de los estadios larvario y adulto de varios miembros de esta familia, sugieren un papel relevante por parte de estas glicoproteínas en la fisiología de estos céstodos. Además, se estudió la presencia de proteínas del huésped en la fracción encontrando que la glicoproteína de 55 kDa correspondía a la cadena pesada de la IgG porcina.

6. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo de tesis fue el de contribuir a la caracterización molecular de las proteínas que se encuentran en la superficie del cisticerco de *T. solium*. Para esto se decidió intentar el aislamiento de clonas de cDNA de proteínas y glicoproteínas de superficie por varias estrategias.

Se describen brevemente algunos nuevos datos sobre la fracción de glicoproteínas (FGp) descrita por Landa et al. (1994), aislada de un extracto crudo de cisticercos por cromatografía de afinidad a Con A. También se describen los esfuerzos de aislamiento de clonas de cDNA de algunas glicoproteínas de esta fracción basados en el uso de anticuerpos y sondas de DNA. Finalmente, se describe la clonación y caracterización de la secuencia codificadora completa de un transportador de glucosa del cisticerco de *T. solium*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES BIOLÓGICOS

A. Cisticercos. Los cisticercos de *T. solium* fueron obtenidos por disección de músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados. Los cisticercos se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.2 (PBS) y rápidamente fueron congelados a -70°C hasta su uso.

B. Sueros hiperinmunes α -Gp1 y α -AgB. Las fracciones de IgG de ambos sueros hiperinmunes de conejos fueron obtenidas previamente como se describe en Landa et al., 1994 y Laclette et al., 1987.

C. Bacterias. Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el presente proyecto fueron:

C600hf1A

fenotipo: *supE44 hsdR thi-1 leuB6 lacY1 tonA21 h1A150*
[chr::Tn10(*tet^r*)]

Y1090hdrR

fenotipo: *supF hsdR araD139 Δ lon Δ lacU169 rpsL*
*trpC22::Tn10(*tet^r*) pMC9*

TG1

fenotipo: *supE hsdA5 thi Δ (lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q*
lacZAM15]

D. Bibliotecas de cDNA. En el laboratorio se dispone de bibliotecas de cDNA con insertos de tamaño seleccionado (> 2 kb) del cisticercos de *T. solium*, construidas en los bacteriófagos λ gt10 y λ gt11 como se describe en Landa et al., 1994.

2. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS.

A. Preparación del extracto crudo (EC). Un extracto crudo de cisticercos de *T. solium*, fue obtenido homogenizando cisticercos congelados en una solución que contiene NaCl 0.5 M, fosfatos 0.015 M (pH 7.4) e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; TLCK 0.1 mM; Leupeptina 25 µg/ml, EDTA 10 mM), en proporción de 5 ml por gramo de tejido húmedo de cisticercos. El homogeneizado fue realizado con un Polytron (Brinkmann Instruments, Co.) a máxima velocidad por 1-2 min. Posteriormente, fue centrifugado a 100,000 g, por 35 min a 4°C; la capa lipídica fue removida de la superficie por succión. El sobrenadante fue dializado contra PBS a 4°C y almacenado a -20°C hasta su uso.

B. Obtención de una fracción enriquecida en glicoproteínas (FGp). Para obtener la FGp a partir del EC, se realizó una cromatografía de afinidad con una columna de sefarosa 4B acoplada a Con A (Sigma Chemical Company). La cromatografía se llevó a cabo a 4°C manteniendo una velocidad de flujo de 20 ml/h utilizando una bomba peristáltica (Microperpex, LKB), como se describe en Landa, 1984. La columna fue equilibrada con PBS (pH 7.4) y una vez pasado el EC se lavó con esta misma solución para eluir el material no unido a la columna. El material unido a la columna fue eluido con una solución de α -metil-D-manósido 0.1 M en PBS (pH 7.4) previa elución del material débilmente unido con NaCl 0.5 M. La fracción eluida con α -metil-D-manósido se concentró por amicon usando membranas diaflo PM10 (Amicon, Inc.). Se determinó la concentración de proteínas y se guardaron las fracciones cuantificadas a -20°C.

C. Cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas en todas las fracciones obtenidas se determinó por el método de Lowry (Mohan, 1992), usando BSA como patrón.

D. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). La composición polipeptídica de las fracciones obtenidas fue determinada por PAGE-SDS, usando geles al 10 y 7.5% de acrilamida, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). La visualización de las bandas de proteínas se realizó por tinción de los geles con azul brillante de Coomassie (Mohan, 1992) y en algunos casos con tinción de plata (Silver Stain Kit, Bio Rad Laboratories). Para la determinación de los pesos moleculares se utilizó una mezcla de proteínas globulares (Bio Rad Laboratories ó Sigma Chemical Company) como patrones.

E. Purificación de las glicoproteínas. Inicialmente, las proteínas fueron separadas electroforéticamente en geles al 7.5%. Posteriormente, se cortaron 6 trozos de gel conteniendo cada una de las fracciones de proteínas, tomando como referencia para los cortes los marcadores preteñidos de alto peso molecular. Se hizo la electroelución de cada una de las bandas, las cuales fueron denominadas P125, P125-88, P88, P88-65, P65, P65-55, según los PM de cada fracción. Se cortaron las bandas de glicoproteínas seleccionadas para finalmente electroeluir las en el sistema "Little Blue Tank" (Isco, Inc.) siguiendo las recomendaciones de fabricante, para el aislamiento de antígenos solubilizados por SDS.

F. Secuencia de aminoácidos. Las proteínas fueron separadas mediante una PAGE-SDS y transferidas a una membrana de PVDF (Millipore, Corporation). Los extremos y una porción central de la membrana fueron teñidos con negro amido 0.1%, metanol al 45% y ácido acético al 10%. Las bandas seleccionadas fueron recortadas y secuenciadas por el Dr. Klaus D. Linseen (BECKMAN, Company).

G. Electrotransferencia de proteínas. Previamente a la transferencia, se resolvieron las bandas proteicas de las fracciones usadas por PAGE-SDS. La cantidad de proteína aplicada por minigel fue de 100-150 μ g para las fracciones de proteínas y

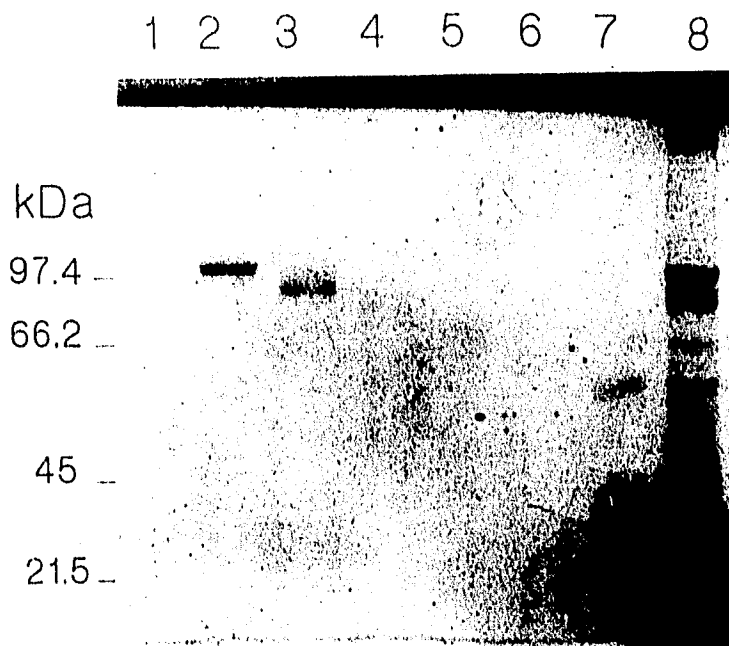


Fig. 3. Purificación de las glicoproteínas. PAGE-SDS al 7.5% teñido con azul brillante de Coomassie donde se observa la FGp obtenida por afinidad a Con A a partir de un extracto crudo de cisticerco y, las bandas de proteínas (P) obtenidas de su fraccionamiento por electroelución. 1: P125; 2: P125-88; 3: P88; 4: P88-65; 5: P65; 6: P65-55; 7: P55; 8: FGp.

aproximadamente 10 μg para las proteínas semipuras. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979). La transferencia se llevo a cabo a 1 amperio constante por 35 min. Para evaluar la calidad de la transferencia, se tñió el papel de nitrocelulosa con solución de Ponceau S (Sigma Chemical Company). El colorante fue lavado con abundante agua destilada.

Se recortaron las tiras según los esquemas de ensayos a realizar:

i) Reconocimiento de proteínas por anticuerpos. Las tiras fueron bloqueadas con BSA al 3% en PBS-Tween 20 al 0.05% durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 por 5 min (cada vez) y se incubaron con los anticuerpos policlonales α -Gp1 o α -AgB a diferentes diluciones en PBS-Tween 20 durante 1-2 h. La incubación se llevo a cabo a temperatura ambiente con agitación constante. Se repitieron los tres lavados y se incubaron con un anticuerpo de ratón α -IgG de conejo (1:2000) conjugado con peroxidasa bajo las mismas condiciones. Finalmente, las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 y una vez con PBS solo para ser reveladas con una solución que contenía 4-cloro-1-naftol 0.05%, metanol 17%, PBS 83% y H_2O_2 0.08%. La reacción fue detenida a los 10-15 min lavando las tiras con abundante agua destilada.

ii) Reconocimiento de las glicoproteínas con Con A. Este reconocimiento se llevó a cabo en forma similar al reconocimiento con los anticuerpos, sustituyendo la incubación de las tiras con el primer anticuerpo por incubaciones con diferentes concentraciones de Con A (Glass et al., 1981; Hawkes, 1982). Además, se hicieron ensayos de competencia con α -metil-D-manósido a diferentes concentraciones.

iii) Tratamiento con metaperyodato. Se siguió el procedimiento descrito por Woodward et al., 1985. Después de la transferencia al papel de nitrocelulosa, éste se bloqueó con PBS que contenía BSA al 3% y Tween 20 al 0.3%, durante toda la noche a 4°C con agitación. Al día siguiente se lavó tres veces con amortiguador de acetato 50 mM (pH 4.5). Posteriormente se cortó

en tiras. Las tiras experimentales se incubaron en una solución de metaperyodato de sodio en amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH 4.5). Se usaron dos concentraciones de metaperyodato de sodio (10 y 20 mM). Las tiras control se incubaron solamente en el amortiguador de acetato de sodio. Esta incubación fue de una hora en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación todas las tiras se lavaron 3 veces con el amortiguador de acetato y se dejaron bloqueando con glicina 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.5) durante toda la noche a 4°C con agitación. Se lavaron las tiras con PBS-Tween 20 y se procedió a incubarlas con el anticuerpo α -Gp1 o Con A, según el protocolo descrito anteriormente.

3. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

A. Titulación de las bibliotecas. Se titularon las bibliotecas de cDNA de fragmentos mayores a 2 kb construidas en los bacteriófagos λ gt10 y λ gt11. Se hizo una dilución 1:50 de un cultivo nocturno de las cepas C600hfa⁺ y Y1090hdxR, respectivamente, en medio LB con 0.2% de maltosa. Se incubó a 37°C por 2 h y se centrifugó a 4,000 g por 10 min a temperatura ambiente. El precipitado de bacterias fue resuspendido en un décimo del volumen inicial en MgSO₄ 0,01 M estéril. Estas bacterias fueron infectadas con diferentes diluciones de cada una de las bibliotecas. La infección se llevó a cabo a 37°C durante 20 min. Posteriormente, las células fueron sembradas en medio LB sólido formando un tapete con medio LB top-agar y se incubaron toda la noche a 37 y 42°C, respectivamente. Al día siguiente se contaron las placas formadoras de lisis (pfl) y se escogió la dilución adecuada para llevar a cabo los tamizajes.

B. Búsqueda de clonas en la biblioteca de λ gt11.

i) PreadSORCIÓN de los Anticuerpos α -Gp1. Antes de llevar a cabo los tamizajes con los anticuerpos policlonales α -Gp1, se

procedió a adsorberlos contra las proteínas de *E. coli*. La adsorción de los anticuerpos fue llevada a cabo por pseudotamizajes con el bacteriofago λ gt11 no recombinante (Sambrook et al., 1989). Se realizaron IET para probar la reacción de los anticuerpos preadsorbidos contra la FGp tratada y no tratada con metaperyodato de sodio.

ii) Tamizaje de la biblioteca con los anticuerpos. Dado el tamaño relativo de la Gp1, se usó la biblioteca de expresión construida en el bacteriofago λ gt11, de fragmentos mayores a 2 Kb. Se infectaron bacterias de la cepa Y1090*hdrR* como se describió arriba y se sembraron en cajas de petri de 132 mm con medio LB-agar. Se crecieron 2-3 h a 42°C hasta que las placas de lisis fueron visibles. Se retiraron de la incubadora y se les colocó filtros de nitrocelulosa HATF (Millipore, Corporation) previamente tratados con IPTG 10 mM. Inmediatamente, se incubaron por un período de 3-5 h a 37°C para la primera copia y 4-6 h para la segunda de cada caja. Los filtros fueron removidos de las cajas y lavados con una solución de Tris.HCl 10 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05% (TNT) para quitar restos de agar. Se colocaron en nueva solución de TNT a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, los filtros fueron incubados 30 min en agitación constante a temperatura ambiente en amortiguador de bloqueo (TNT con BSA al 3%). Se incubó con los anticuerpos α -Gp1, preadsorbido con un extracto de bacterias (ver arriba). Se lavaron los filtros tres veces por 10 min. El primero y el último lavado se hicieron con TNT y BSA 0.1%; el segundo con TNT-BSA 0.1% y Nonidet P-40 al 0.1%. Se incubó el segundo anticuerpo (α -IgG de conejo peroxidado) por 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron los filtros como se describió arriba, se hizo un último lavado con una solución de Tris.HCl 10 mM (pH 7.5) y NaCl 150 mM y se revelaron con 100 ml de Tris.HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM que contenía 60 μ l de H₂O₂ al 30% con 60 mg de 4-Cl-1-Naftol en 20 ml de metanol frío. La reacción de lavado fue detenida lavando los filtros con abundante agua destilada (Sambrook et al., 1989).

C. Búsqueda de clonas en la biblioteca de λ gt10.

i) Obtención de las sondas. El oligonucleótido/sonda Gp88 se diseñó a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida de la Gp de 88kDa. Para el aminoácido R (arginina) sólo se tomaron los dos primeros nucleótidos de los codones que aparecen con mayor frecuencia en los genes secuenciados en *T. solium*, con el fin de disminuir el grado de degeneración del oligonucleótido. El oligonucleótido fue sintetizado en la unidad de aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM, México).

Para obtener la sonda GTP se sintetizaron tres oligonucleótidos degenerados, ricos en C-G, a partir de regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos de transportadores de glucosa humanos y de *S. mansoni* (Fukumoto et al., 1988; Skelly et al., 1994). En el diseño de los oligonucleótidos se tomó en cuenta el uso de codones encontrado en los genes de *T. solium* secuenciados hasta el momento.

iniciadores directos:

NH₂- P F C P E S P -COOH
GTP-1CG 5'-CCCTTCTGCCCCGA (AG) (TA) (G/C) (ACGT) CC-3'

NH₂- Q Q F S G I N ..(G/A) -COOH
GTP-2CG 5'-CAGCAGTTCTCCGGCAT (ACT)AA (CT)G-3'

iniciador reverso:

COOH- G D F T R G K T ... E -NH₂
GTP-3CG 5'-TCGTGGAAGGTGCGGCCCTT (ACGT)GT (TC)TC-3'

Se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando como templado DNA de aproximadamente 200 mil fagos de λ gt10 de la biblioteca de cDNA del cisticerco de *T. Solium*. La PCR se llevó a cabo como sigue: 5 ciclos, 94°C/3 min,

50°C/3 min,
72°C/3 min,
25 ciclos 94°C/30 s,
50°C/1 min,
72°C/1 min.

El producto de PCR fue separado en geles de agarosa al 1% en Tris-acetato (TAE). Se recortó la región del gel donde migra la banda de DNA de 500 pb, y se purificó por afinidad al polvo de vidrio. Se hizo un segundo PCR a partir del purificado anterior bajo las mismas condiciones que el primero.

El fragmento de DNA, de tamaño esperado, se purificó por la misma técnica y se usó como sonda en el tamizaje de la biblioteca.

ii) Marcaje radioactivo de las sondas. El oligonucleótido elaborado a partir de la secuencia parcial de la proteína de 88 kDa fue marcado radiactivamente con ^{32}P (ICN Biomedicals, Inc.) por el método de Richardson (Sambrook et al., 1989). La sonda GTP fue marcada radioactivamente con ^{32}P (Amersham International, PLC) por el método de "Random Primer" (Random Primer DNA Labeling Kit; U.S.B.).

iii) Tamizaje de la biblioteca de $\lambda\text{gt}10$. Los tamizajes se realizaron siguiendo la técnica de Benton y Davis (1977). Para aumentar la posibilidad de encontrar clonas completas se decidió utilizar la biblioteca de cDNA del cisticerco de *T. solium* cuyos fragmentos de cDNA eran mayores a 2 kb. Las bacterias C600hfa⁺ fueron infectadas y sembradas en medio LB sólido como se describió previamente. Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C. Los fagos obtenidos en las pfl fueron transferidos a membranas de nylon (Amersham International, PLC) por duplicado. Los filtros fueron tratados con una solución desnaturalizante (NaOH 1.5 M; NaCl 0.5 M) por 10 min y posteriormente neutralizados con una solución de Tris.HCl 0.5 M (pH 7.4) y NaCl 0.5 M. El DNA de los fagos fue fijado a las membranas por exposición a luz U.V. (120 milijoules/cm²). La sonda Gp88 se usó

en el tamizaje de aproximadamente 60,000 fagos bajo condiciones de poca astringencia (hibridación a 37°C y lavados con SSC 4X). La sonda GTP fue usada en el tamizaje de 80,000 fagos en condiciones de alta astringencia (hibridación a 65°C y lavados con SSC 2X). Las señales de hibridación fueron detectadas por autoradiografía después de la exposición de los filtros por 12-24 h a -70°C, con pantalla amplificadora. Las placas se recuperaron directamente de las cajas de petri por succión con pipeta Pasteur colocándolas en 200 µl de SM. Se dejó difundir los fagos a 37°C por 2h y se guardaron a 4°C para su posterior análisis.

D. Amplificación del DNA por PCR. Se realizó una PCR, usando como templado 50-100 ng de DNA de los fagos recombinantes, con oligonucleótidos que flanquean el sitio de clonación en el fago λgt10 (oligos λgt10 5' y λgt10 3') y permiten amplificar el inserto. Se realizó una segunda PCR con los oligos GTP-2CG y GTP-3CG para verificar la especificidad de las clonas. Las reacciones se llevaron a cabo como sigue: después de 5 ciclos a 94°C/3 min, 40°C/3 min; 72°C/3 min, se realizaron 25 ciclos a 94°C/30 segundos; 50°C/1 minuto; 72°C/1 minuto. Los productos de las reacciones fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE. Los fragmentos amplificados fueron purificados como se describió arriba.

E. Secuenciación directa de fragmentos obtenidos por PCR. Se usó la técnica de secuenciación ciclotermal (Thermal cycle sequencing) usando la enzima Vent_rTM (exo-) DNA polimerasa (CircumVentTM Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit; BioLab). Se hizo la secuenciación parcial de las cinco clonas obtenidas. Este método se usó en forma alternativa para confirmar la identidad de las clonas antes de proceder a subclonarlas en el fago M13.

F. Subclonación en el vector M13.

i) Ligación de los insertos de las clonas al M13. Los productos de PCR de las clonas 1, 17 y 18 usando los oligonucleótidos λ gt10 5' y λ gt10 3' fueron tratados con la enzima klenow (Sambrook et al, 1989). Los fragmentos de DNA respectivos fueron ligados en DNA del fago M13mp19 digerido previamente con la enzima de restricción Sma I. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l a 16°C durante toda la noche.

ii) Transformación bacteriana. Células bacterianas de la cepa TG1 de *E. coli* fueron preparadas para electroporación de la siguiente manera: las bacterias se crecieron a 37°C hasta una densidad de 0.5-1.0. El cultivo fue centrifugado a 4,000 g por 15 min y el pellet bacteriano se resuspendió en un volumen similar de agua bidestilada estéril. Se centrifugó bajo las mismas condiciones y se resuspendió el pellet en 0.5 volúmenes de agua. Se hicieron tres lavados más resuspendiendo en 0.5, 0.02, y 0.002 volúmenes de agua. Todos los lavados se llevaron a cabo a 4°C. Las células fueron guardadas a -70°C en 10% de glicerol estéril. Se electroporó 1 μ l de la mezcla de ligación en 40 μ l de las células bacterianas en el "Electro Cell Manipulator[®]600" (BTX, INC., 1992). Las bacterias transformadas fueron crecidas en 1 ml de medio LB por 1 h y sembradas sobre cajas del mismo medio en una capa de agar al 0.7%, 1.5 mg de Blue-gal y 0.48 mg de IPTG.

iii) Identificación y análisis de recombinantes. Las bacterias infectadas por el fago se identificaron por las placas de crecimiento lento formadas entre el tapete de bacterias no infectadas y, entre éstas, las que poseían el inserto por ser translúcidas a diferencia de las placas azules que poseían el fago sin inserto. Además, se seleccionaron clonas con insertos de orientación opuesta por el método de Gardner (Sambrook et al., 1989).

iv) Purificación del DNA de cadena sencilla a partir de las partículas virales. Se inoculó 3.5 ml de medio LB fresco con 100 μ l de un cultivo nocturno de células TG1 con cada templado y se

dejó crecer a 37°C por 5-6 h con agitación continua. El cultivo fue centrifugado a 16,000 g durante 10 min y los fagos, presentes en el sobrenadante, fueron precipitados con 4% de polietilenglicol y 0.5 M de NaCl (PEG). Las proteínas víricas fueron extraídas con fenol-cloroforno y el DNA fue sometido a una precipitación etanólica. El DNA fue resuspendido en agua bidestilada y el 10% fue corrido en un gel de agarosa al 1% en TBE.

v) Secuenciación del DNA. La reacción de secuenciación se llevó a cabo por el método de terminación de cadenas por didesoxinucleótidos (Sanger et al., 1977), utilizando el kit de secuenasa versión 2.0 (U.S.B. Corporation). Las reacciones de secuenciación fueron sometidas a electroforesis en geles de acrilamida 7.4, 6 y 4%, bisacrilamida 0.4% y urea 50% en TBE. Se realizó la secuencia en ambas direcciones de las clonas 1, 17 y 18. La secuenciación se llevó a cabo diseñando oligonucleótidos que se unen a los extremos y a las regiones intermedias de los insertos.

G. Análisis de las secuencias. Los análisis por computadora de las secuencias obtenidas fueron llevados a cabo con el programa PC/GENE (Intelligenetics, INC.). La comparación de la secuencia con las disponibles en bases de datos (GENBANK, SWISSPROT, etc.) fue realizado con el programa Blast (que usa el algoritmo de Lipman-Pearson, 1985) a través del Internet.

IV. RESULTADOS

Puesto que el objetivo de la presente tesis fue el de contribuir a la caracterización de glicoproteínas de superficie del cisticerco (ver introducción), se decidió intentar el aislamiento de clonas de cDNA por varias estrategias. Inicialmente se intentó purificar algunas glicoproteínas para secuenciar su extremo amino terminal y diseñar oligonucleótidos específicos que fueran usados como sondas. Asimismo se intentó aislar algunas clonas usando anticuerpos dirigidos hacia proteínas de superficie, obtenidos previamente. Finalmente, el enfoque que resultó productivo fue el de aislar clonas por homología con otras glicoproteínas descritas en organismos eucariotas.

En el presente capítulo, inicialmente se describen brevemente algunos nuevos datos sobre la fracción de glicoproteínas (FGp) descrita por Landa et al. (1994), aislada de un extracto crudo de cisticercos por cromatografía de afinidad con Con A. También se describen los esfuerzos de aislamiento de clonas de cDNA por las estrategias mencionadas arriba. Finalmente se describe la clonación y caracterización de la secuencia codificadora completa de un transportador de glucosa del cisticerco de *T. solium*.

1. CARACTERIZACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS DEL CISTICERCO.

El extracto crudo (EC) de cisticercos está formado por una mezcla compleja de proteínas con pesos moleculares (PM) entre 10 y 200 kDa. La FGp es de una complejidad menor (15-20 proteínas), siendo las más abundantes las de peso molecular aproximados de 110, 98, 88, 75, 62, 57, 54, 50 y 45 kDa (Fig. 3, carril 8). El Western blot de la FGp revelado con Con A, muestra 22 bandas entre 35-200 kDa (Fig. 4 y 5). Las bandas más intensas corresponden a las proteínas de 110, 98, 88, 65, 62 y 55 kDa.

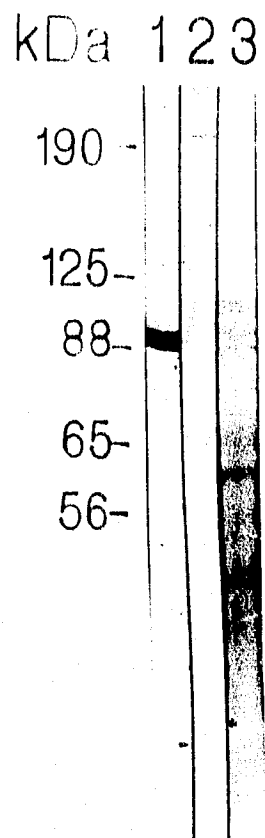


Fig. 4. Obtención de la FGp por afinidad a Con A a partir de un extracto crudo de cisticercos de *T. solium*. Western blot de la FGp tratada con 1: anticuerpos α -AgB; 2: anticuerpos α -Gp1; 3: Con A.

La proteína de 23 kDa, que se tiñe con azul de Coomassie y no es revelada con Con A corresponde a pequeñas cantidades de la lectina que se desprenden de la columna, como había sido demostrado anteriormente (Landa, 1984).

Para comprobar la unión específica de la Con A a los residuos carbohidratos de las glicoproteínas, se realizaron ensayos de inhibición con metaperyodato de sodio y con α -metil D-manósido. Como era de esperarse, el tratamiento de la FGp con metaperyodato de sodio 10 mM inhibió la unión de Con A. Asimismo, la unión de Con A con las glicoproteínas es inhibida completamente por el manósido 0.5 M (Fig. 5).

También se determinó si la FGp contiene cantidades detectables de antígeno B (AgB). El Western blot de la FGp revelado con un suero hiperinmune α -AgB muestra una banda de aproximadamente 98 kDa, confirmando la presencia del AgB en la fracción (Fig. 4). Sin embargo, en pruebas paralelas usando AgB puro se puede mostrar que la Con A no lo reconoce. Esto indica que el AgB debe asociarse con alguna(s) de las glicoproteínas para retenerse en la cromatografía de Con A (Fig. 6).

2. CLONACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS

En un intento por identificar y caracterizar molecularmente las proteínas que el cisticerco presenta en su superficie, se siguieron tres estrategias para la clonación de sus genes.

A. Purificación de glicoproteínas. La purificación de estas proteínas nos permitiría obtener una secuencia parcial para diseñar oligonucleótidos que pudieran ser usados como sondas en el tamizaje de la biblioteca del cisticerco de *T. solium*.

Los resultados de la electroelución de las diferentes subfracciones (P125, P125-88, P88, P88-65, P65, P65-55) se muestra en la figura 3. El patrón de bandeo en cada una de las fracciones

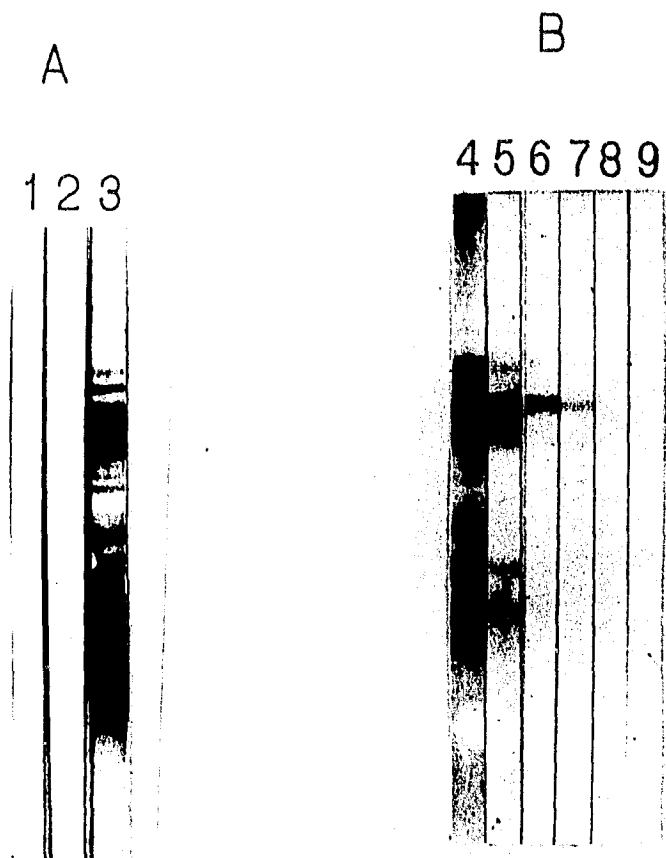


Fig. 5. Especificidad de la unión de la Con A a la FGp. **A:** inhibición no competitiva (tratamiento con metaperyodato de sodio). **B:** inhibición competitiva (tratamiento con α -metil-D-manosa). Western blot de la FGp donde todos los carriles (menos el 9) fueron incubados con Con A 100 μ g/ml. 1: NaIO₄ 10 mM; 2: NaIO₄ 20 mM; 3 y 4: no tratada. 5: α -metil-D-manosa 10 mM; 6: α -metil-D-manosa 100 mM; 7 y 9: α -metil-D-manosa 200 mM; 8: α -metil-D-manosa 500 mM.

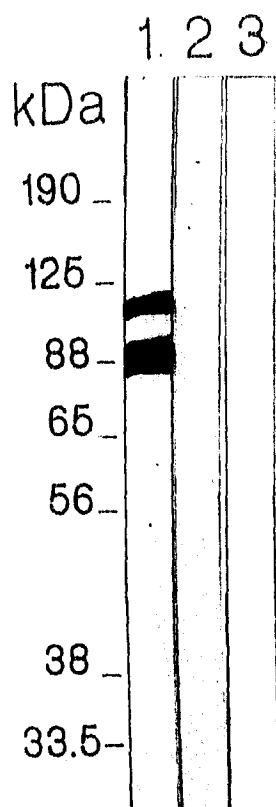


Fig. 6. Ausencia de N-glicosilación en el AgB. Western blot del AgB purificado por colágena a partir de un extracto crudo de cisticerco de *T. solium*, tratado con 1: anticuerpos α -AgB; 2: anticuerpos α -Gp1; 3: Con A 100 μ g/ml.

(carriles 1-7) corresponde con el esperado (carril 8). Se decidió trabajar en la purificación de las proteínas de 110, 98 y 88 kDa que presentaban las mejores propiedades tintoriales con azul de Coomassie y Con A. Entre ellas la proteína de 88 kDa que parece libre de contaminación con AgB (Fig. 7) se transfirió a papel PVDF y se envió a secuenciar a un servicio comercial. Los resultados mostraron que se trataba de una mezcla de proteínas, sin embargo, una secuencia aparecía como dominante. Esta secuencia de 11 aminoácidos (Fig. 8) fue comparada computacionalmente por el servicio de Blastp, no encontrándose homología significativa con otra proteína en las bases de datos.

A partir de la secuencia de aminoácidos ADFEQNR se diseñó una mezcla de oligonucleótidos que fueron utilizados para tamizar una librería de cDNA en λ gt10, de cisticercos de *T. solium* (Fig. 8). Sin embargo, no se obtuvieron clonas convincentemente positivas. Las proteínas de las fracciones P125-88 y P88 se trabajaron juntas en los intentos de purificación. El Western blot revelado usando Con A muestra tres proteínas de 110, 98 y 88 kDa. Sin embargo, análisis similares con el suero α -AgB indica que este antígeno, que ha sido ampliamente caracterizado, es un contaminante no N-glicosilado de la fracción (Fig. 9). Esto dificulta la purificación de estas glicoproteínas por electroelución, por lo que actualmente se intenta su aislamiento por otros métodos.

B. Intentos de clonación usando anticuerpos α -glicoproteínas. En el laboratorio se dispone de anticuerpos policlonales inducidos por la glicoproteína de 180 kDa denominada Gp1 (Landa et al., 1994). Ensayos de Western blot indican que estos anticuerpos reconocen dos bandas de alto PM (180 y 200 kDa) en la FGp (Fig. 4). Ambas bandas se tiñen débilmente con Coomassie y Con A. Antes de usar los anticuerpos α -Gp1 para tamizar la biblioteca de expresión se decidió determinar si reconocen epítopes no-carbohidrato. Como se muestra en la figura 10, los anticuerpos α -Gp1 aún reconocen la Gp1 después de un

kDa 12

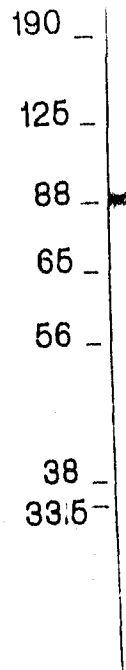


Fig. 7. Purificación de la glicoproteína de 88 kDa. Western blot de la proteína tratada con 1: Con A; 2: Anticuerpos α -AgB.

A:

aminoácidos (aa): A D F E Q N R G P N R

N° codones por aa: 4 2 2 2 2 2 6 4 4 2 6

B:

A D F E Q N R

5' GC(A/C/G/T) GA(C/T) TT(C/T) GA(A/G) CA(A/G) AA(C/T) CG 3'

Fig. 8. A: Secuencia de aminoácidos obtenida por degradación de Edman a partir de una membrana de PVDF que contenía la Gp88 (realizado por el Dr. Klaus D. Linseen de la compañía BECKMAN, USA). **B:** Mezcla de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos ADFEQNR para ser usados como sonda en el tamizaje de la biblioteca de λ gt10.

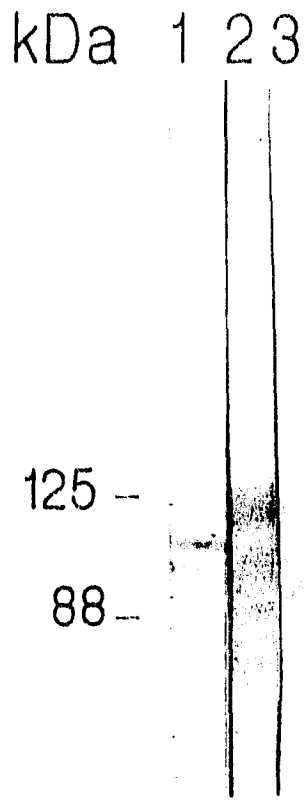


Fig. 9. Presencia del AgB en la FGp. Western blot de la FGp revelado con 1: anticuerpos α -AgB; 2: Con A; 3: negro amido.

tratamiento con metaperyodato para oxidar la fracción carbohidrato (Fig. 10). En contraste, la Con A ya no se une con ninguna glicoproteína cuando se aplica el mismo tratamiento (Fig. 5).

Para remover los anticuerpos dirigidos a epítopes bacterianos que pudieran ocultar el reconocimiento de Gp1, la fracción de IgG del suero α -Gp1 fue preadsorbida por seudotamizaje hasta que el fondo se redujo casi totalmente. En contraste el reconocimiento de los anticuerpos contra la Gp1 tratada y no tratada con metaperyodato de sodio no fue afectado (Fig. 11). Finalmente se realizó el tamizaje de 20,000 fagos sin obtener clonas positivas. Puesto que simultáneamente se habían logrado clonas de transportadores de glucosa (ver abajo), se discontinuó esta estrategia. Sin embargo, no se considera que el enfoque haya sido fallido puesto que el número de clonas estudiadas fue bajo, por lo que debe reintentarse el tamizaje con estos anticuerpos.

C. Clonación de proteínas transportadoras de glucosa (GTPs). Una tercera estrategia que resultó productiva fue la búsqueda de proteínas de superficie aprovechando su similitud con proteínas homólogas en su secuencia de aminoácidos. Para ello se diseñaron oligonucleótidos a partir de esas regiones conservadas. Los transportadores de glucosa son proteínas integrales de membrana que se encuentran en una variedad de organismos desde mamíferos hasta protozoarios (Maiden et al., 1987; Celeza et al., 1988; Cairns et al., 1989; Kayano et al., 1990). En general, estas proteínas presentan un sitio único de N-glicosilación en la asa externa entre la primera y segunda región transmembranal. Recientemente se describieron tres genes que codifican para GTPs en *S. mansoni*, un parásito platihelminto cercano a *T. solium* (Skelly et al., 1994). El análisis de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas en conjunto con GTPs humanas reveló tres secuencias consenso (Fig. 12). A partir de estas tres regiones se diseñaron oligonucleótidos degenerados para ser

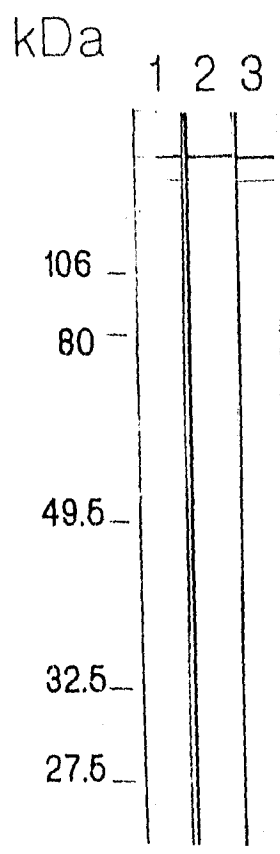


Fig. 10. Reconocimiento de epítomos proteicos en Gp1 por los anticuerpos α -Gp1. Western blot de la FGp tratada con 1: NaIO₄ 10 mM; 2: NaIO₄ 20 mM; 3: no tratada.

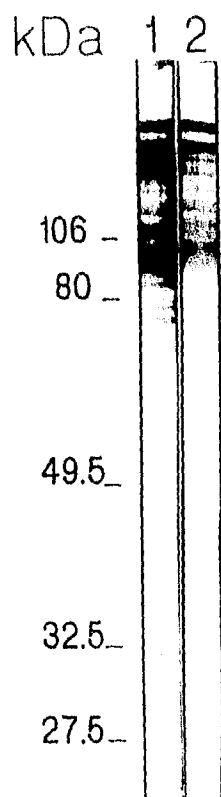


Fig. 11. Reconocimiento de la Gp1 por los anticuerpos α -Gp1 adsorbidos contra antígenos de *E. coli*. Western blot de la FGp con los anticuerpos α -Gp1 preadsorbidos. 1: FGp tratada con NaIO_4 10 mM; 2: FGp no tratada.

```

GLUT1. MEPEKRTAAGELMA-VKRALES-IGPTVNVVHNDKVVDEEF
GLUT2. MEERRVNTLVEF-VYKALGS-IRKYPNGVHNDKVVDEEF
GLUT3. MTTKRVVHALLFA-VYKALGS-IRKYPNVVHNDKVVDEEF
GLUT4. MEEGPOQIGSDDEPQKAVIGLILA-MEVALES-IGPTVNVVHNDKVVDEEF
SGTP1. MGVASNGITIGKILVLA-VLTCREKPTGQVNLKVLDFRNLHETP
SGTP2. TQLKPFLLD-YCITLSEFEPHAYHNVVNDKVVDEEF
SGTP4. MEEGRVFTSELS-VLLACIGSPPTGYNLKVNLKVVDEEF

GLUT1. -----KQVWERYCESILPTT-----LITLSELE
GLUT2. RHTLVVPIELREHAINVYINSTEELPTIYSQNEFPIWKEEINVAACLITLSELE
GLUT3. -----NHTLTKGJAFSEEL-----LITLSELE
GLUT4. -----RHWLRGCGPREGSIPPEI-----LITLSELE
SGTP1. -----NEMVAVITFIELD-----SFFETNV
SGTP2. -----NITLAWGVCTEESI-----DLLESLK
SGTP4. SRTMLEK-----NASSAENTANLMP-----SFLVAVY

GLUT1. VAFSEVGMIGSEFVGLFVWPKRPNEMVNRLLAFVSVLWQPSKLGKSPFLLIGP
GLUT2. VSEFVQGMIAHFFRGLDGLRTRFAMLVNLSLWGLLWQPSKLGKSPHLLIIGP
GLUT3. VAFSEVGMIGSEFVGLFVWPKRPNEMLVNLSLWGLLWQPSKLGKSPHLLIIGP
GLUT4. VAFSEVGMIGSEFVGLIISWGLRKRAMLVNRVNLWGLLWQPSKLGKSPHLLIIGP
SGTP1. STTFVAAAIQAFEGQVWADGLRRLNLTLNKVVIGTIGVIVGFCVWQKQBALLVGP
SGTP2. VTSPLQGFQGLIGVNLKLRRLNLTLLSIPVIGSLMPEFHWQGFEMLIGK
SGTP4. STAPVAAAIQAFEGQVWADGLRRLNLTLNKVVIGTIGVIVGFCVWQKQBALLVGP

GLUT1. FTIGVYCLLTGQVWVYGEVSPITAFKGLFTLHIGIIVGILIAQVGLDSINMND
GLUT2. SIIGLYCGLIGGLVMYIGEIAPTALRGALTFKGLAIYVGHISQIIGLEFLKEND
GLUT3. LVIGLFCGLIGGLVMYIGEISPTALRGALTFKGLAIYVGHISQIIGLEFLKEND
GLUT4. FLIGVYSGITGGLVMYVGEIAPITLHIGALFTLHIGIIVGILIAQVGLDSINMND
SGTP1. FVIGVSSITIGIASLITLWAFEDLGGIAGKGLAVVIGAFSFTPTPELLNLA
SGTP2. FTIGIACQAVVIGIMFLEIAPVNRGAGFTFVNVVSAIILSQVLSLPEWASITE
SGTP4. VNRGAVPISMSIARVLTETAPFLRGGISLLELALITIGIIVSVMITLTYTNTPT

GLUT1. LKPLLSIIPAPALQCVLPHVYDSEFLLIRREERAKSVIAGLGTALVT-DEL
GLUT2. LKHLLGLGVRALQGLLLFPYDSEFVLYIKLDEEVKARCLKRLRGTDTV-KDI
GLUT3. LKPLLSGFTIIPALQSAALPFCFESPRFLLIRREERAKSVIAGLGTALVT-CDI
GLUT4. LKPLLSGFTIIPALQSAALPFCFESPRFLLIRREERAKSVIAGLGTALVT-CVI
SGTP1. LKPLLAWLGAVPAALISVLPFCFESPRFLLIRREERAKSVIAGLGTALVT-TFI
SGTP2. LKPLLALCTVSSVHILLFPYDSEFTYLYIKLDEERRESENLVYLRGQKCV-HAE
SGTP4. LKPLSVAVGSPALIALILLFPYDSEFRLFKKGRKARKAPRLICIEDIN-ETF
GTP-100

GLUT1. QEMK-RESRQMPRENVTILELFRSAYRQPTLIWVLCISQVSGRNNFYFYSIF
GLUT2. MNR-REERASSEKVSITQLPKSSVYCPILVWMLWALQVSGRNTFYFYSIF
GLUT3. QEMK-DESARMSQGFQVWLELFRVSSVYRPIISIVLQSQVSGRNVFYFYSIF
GLUT4. AELK-REERLEREBELLLQLGSRITFCPLIWAIVLQSQVSGRNVFYFYSIF
SGTP1. GELR-REIEVAKYQVFFPTQFPDLRMPVLAQLIQVLSGRNVFYFYSIF
SGTP2. LELL-REIEGSSVTHSRVCLLRIIPYLRGLVVALVPHIGVSGRNVFYFYSIF
SGTP4. NMR-REMRKRRPKRFRFLPQRLRMPVLAQLIQVLSGRNVFYFYSIF
GTP-100

GLUT1. EYAGV--QPPVATIGSGIVHTAFTVSLFVVERAGRRTLLHIGLAGHAGCALMTIA
GLUT2. QTAGI--SKPVIATIGVAVMIVTAVSVFLVFKAGRRLLFLIGSMFVCAIPASVG
GLUT3. KTAGV--QPIVATIGAVVNTIPTVSLFVVERAGRRTLLHIGLAGHAGCALMTIVS
GLUT4. ETAGV--QPAVATIGAVVNTIPVLSVLLVERAGRRTLLHIGLAGHAGCALMTIYVA
SGTP1. ELAGIPDVLYQVFAIGVNVIVVSVLPIERAGRRTLLHIGLAGHAGCALMTIIF
SGTP2. ISNGLTRQVAVNLCIGVTLIGAFASIVFERGRRTLLHIGLAGHAGCALMTIIF
SGTP4. RTAGIPWVYQPCWVWPAIWNVIVSVLPIERAGRRTLLHIGLAGHAGCALMTIIF

GLUT1. LLLLEQLNMS-----VLSVALFCVAFVEVCPHINFIVAELFSCQPRPAALV
GLUT2. LVLAKESNMS-----VYSLALFLVSPFEIGHPHVMWAEFSCQPRPAALV
GLUT3. LLLLEKNSMS-----VYVGLALFLVSPFEIGHPHVMWAEFSCQPRPAALV
GLUT4. LLLLEKNSMS-----VYVGLALFLVSPFEIGHPHVMWAEFSCQPRPAALV
SGTP1. VRLADSGPSTYI-AMSTISIILLIYACFALGLGVPVALVSEIFPQCPRAAVSL
SGTP2. LILKQVIEINKL---TILSIVLTYTTLVGFVS---IPAVLSELVFCERDAVSI
SGTP4. VDIASSTKDPPTTAGIISAVLIILITICGFALGLPFGVVAEIFRQCPRAAVSL

GLUT1. MGFNMTSNFIVACQVVEGLOSPVFIIFTVLLVFFIIFYVWVETKRRFFEDIA
GLUT2. MGFNMTSNFIVACQVYADFGSPVFFLAGLALFLTFYVWVETKRRFFEDIA
GLUT3. MGFNMTSNFIVGLFFSVAHYIYAVVFIIFTVLLVFFIIFYVWVETKRRFFEDIA
GLUT4. MGFNMTSNFIVASQVVAEMVYVRLLEAVLLCFIIFTVWVETKRRFFEDIA
SGTP1. GSKKWLKSLVLSQVYVICHVGTSLPFLVAVICWIFPFLMPTKRRFFEDIA
SGTP2. MGFNMTSNFIVACQVYADFGSPVFFLAGLALFLTFYVWVETKRRFFEDIA
SGTP4. MGFNMTSNFIVACQVYADFGSPVFFLAGLALFLTFYVWVETKRRFFEDIA
GTP-100

GLUT1. GDFRQGGQCEFTPEELFRLGADGCV
GLUT2. ADFRQGGQCEFTPEELFRLGADGCV
GLUT3. ADFRQGGQCEFTPEELFRLGADGCV
GLUT4. ADFRQGGQCEFTPEELFRLGADGCV
SGTP1. RELAPGHIWSPKTTALEDRNLVFTKQRFEGFASSELLYPSEKMGVIA
SGTP2. EYMRVCGFRGTENENPTFDILEDVQY
SGTP4. ADLATAKVVACCPFRSRTVYREEIFYSDE

```

Fig. 12. Alineación de la secuencia de aminoácidos de transportadores de glucosa humanos (GLUTs) y de *Schistosoma mansoni* (SGTP1, SGTP2, SGTP4). Los sitios sombreados muestran las regiones conservadas en la estructura primaria de estas proteínas que fueron usadas para la construcción de los oligonucleótidos señalados.

probados por PCR en la búsqueda de una sonda específica para las TGTPs (ver métodos).

Se realizaron amplificaciones de cDNA del cisticerco por PCR con las parejas de oligonucleótidos GTP-1CG/ GTP-3CG y GTP-2CG/GTP-3CG. De la PCR con la pareja de oligonucleótidos GTP-2CG/GTP-3CG se obtuvo un fragmento de 500 pb, que es el tamaño esperado (Fig. 13), mientras que no se obtuvo ningún producto de la PCR con los oligonucleótidos GTP-1CG/GTP-3CG.

El fragmento de PCR fue purificado, marcado radioactivamente y usado como sonda en el tamizaje de la biblioteca de *λgt10*. Se plaquearon aproximadamente 80,000 fagos y se tamizaron en condiciones de alta astringencia, obteniendo una frecuencia de clonas positivas de 1:2000. Se eligieron 20 clonas al azar que se numeraron del 1 al 20 y se realizaron tamizajes secundarios y terciarios hasta obtener cinco clonas aisladas: 1, 8, 17, 18 y 20, para ser caracterizadas.

Se purificó el DNA de las 5 clonas aisladas (Fig. 14). Para determinar el tamaño de los insertos se hicieron amplificaciones por PCR usando iniciadores universales para *λgt10* (ver métodos). Los insertos de las cinco clonas resultaron de un tamaño cercano a las 1800 pb (Fig. 15). Para confirmar la identidad de los insertos, se realizó una PCR con los oligonucleótidos GTP-2CG y GTP-3CG; cuatro de las cinco clonas (1, 8, 17 y 20) mostraron un amplificado del tamaño esperado de 500 pb (Fig. 16). La clona 18 mostró un amplificado más pequeño (Fig. 15). Los insertos de las clonas 1, 17 y 18 fueron subclonadas en M13 para ser secuenciados por el método de terminación de cadenas por dideoxinucleótidos.

La clona 17 mostró un marco abierto de lectura de 1500 pb, con una región río abajo de 156 nucleótidos, donde se observa la señal de poliadenilación AATAAA (Fig.17). La secuencia de aminoácidos deducida corresponde a una proteína de 500 aminoácidos con un peso molecular de 54.5 kDa, lo que sugiere que se trata de la secuencia codificadora completa de esta proteína. Esta secuencia presenta las regiones consenso CPDSPR, QQFSGINA, y

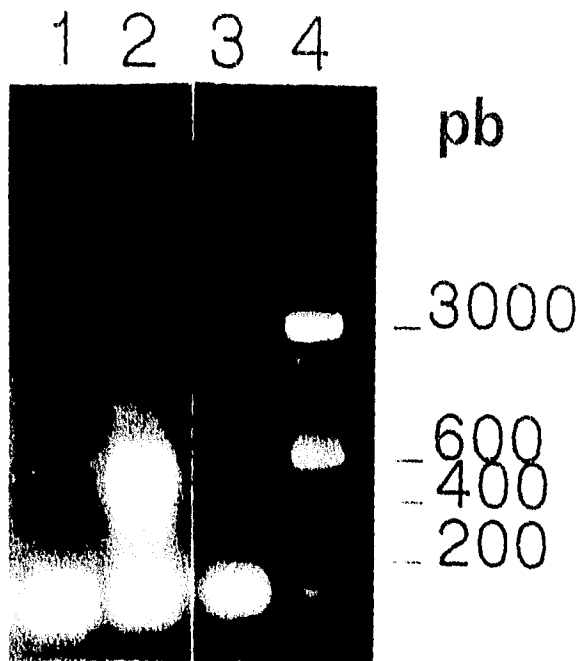


Fig. 13. PCR con los oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de regiones conservadas entre los transportadores de glucosa humanos y de *S. mansoni*, usando como templado el cDNA del cisticerco de *T. solium*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa los resultados de la PCR con 1: GTP-1CG y GTP-3CG; 2: GTP-2CG y GTP-3CG; 3: control negativo; 4: Marcador de 100 pb. El fragmento de ~500 pb obtenido de la PCR con los oligonucleótidos GTP-2CG y GTP-3CG fue utilizado como sonda en el tamizaje de la biblioteca de cDNA del cisticerco de *T. solium*.

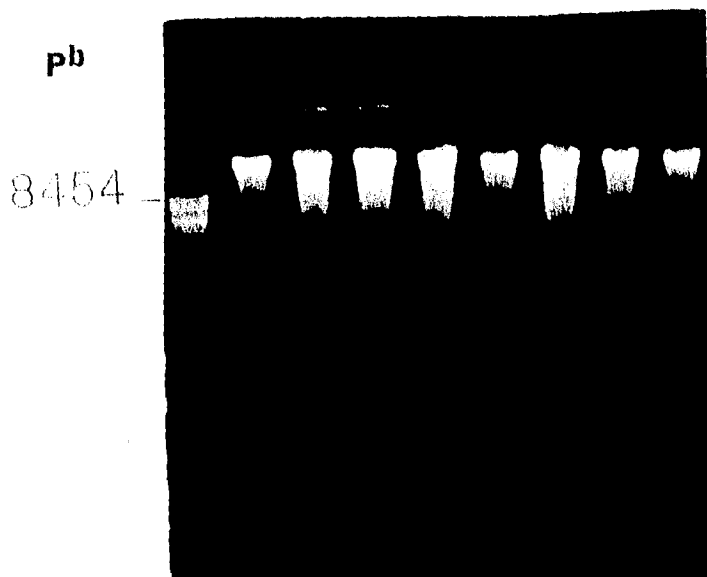


Fig. 14. Purificación del DNA de los fagos recombinantes positivos en el tamizaje de la biblioteca de λ gt10 con el producto de PCR con los oligos degenerados GTP-2CG y GTP-3CG. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa 1: PM, λ BstE II; 2-9: DNA de los fagos recombinantes de diferentes clonas.

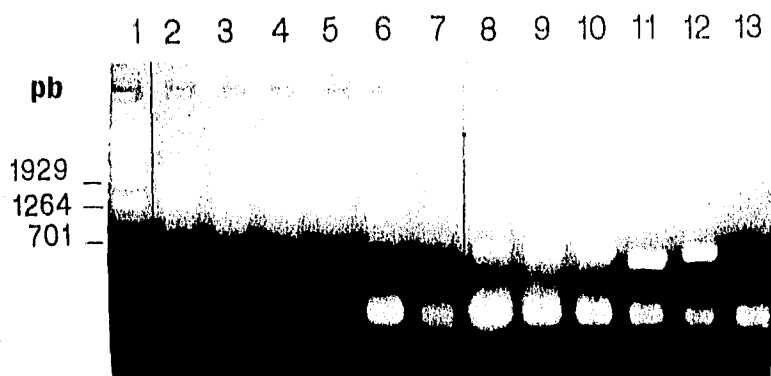


Fig. 15. Tamaño de los insertos y especificidad de las clonas positivas obtenidas en el tamizaje de la biblioteca de λ gt10 del cisticerco de *T. solium*. El tamaño de los insertos se determinó por PCR usando los oligonucleótidos λ gt10 5' y λ gt10 3' (carriles 2 al 7). La especificidad de las clonas se determinó por PCR usando los oligonucleótidos GTP-2CG y GTP-3CG (carriles 8 al 13). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el amplificado obtenido por PCR de 1: PM, λ BstE II; 2 y 8: clona 1; 3 y 9: clona 8; 4 y 10: clona 17; 5 y 11: clona 18; 6 y 12: clona 20; 7 y 13: controles negativos.

Iniciador directo:

		Q Q F S G I N G/A
GTP-2CG	5'-	<u>CAGCAGTTCTCCGGCATAAATG</u> -3'
		Q Q F S G I N A
TGTP2	5'-	<u>CAACAGTTTTCCGGAATAAATG</u> -3'

Iniciador inverso:

		G D F T R G K T E
GTP-3CG	5'-	<u>TCGTGGAAGGTGCGGCCCTTCGTCTC</u> -3'
		D C P A R G K T E
TGTP2	5'-	<u>TCACAAGGCGCTCCGCCCCTTCGTCTC</u> -3'

Fig. 16. Comparación de los oligonucleótidos GTP-2CG y GTP-3CG con las secuencias obtenidas en la clona TGTP2. Estos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias consenso QQFGIN y ETKGR. La PCR con estos oligonucleótidos amplificó un fragmento de 500 pb que se usó como sonda en la clonación de TGTP2.

TGAATTCGGGGCCGGTTCATTCGGAACCGTATGGAATTCGCTGTCGATTTGTCTCACATAA

1 ATGGTTAACITCCACTACGTATTCGCTACAGTGGTGATTTGCTCTTCATTTTCAGTTCGGTTTCCAAACCGGAGTTATTAATAGTCCCTCFCGGC 33
M V N E H Y V F A T V V I V F G S S E O F G F Q T G V I N S P L P

101 TAATCGAAAAATACATCCTAAGCATATGTGAGGACAGAGGCAGTTCACCTTCACCAGAGTTCGTTCCAGGCAATGAGCAGCCCTCGTGGTTCGCTTC 67
L I E K Y I L S I C E D R G S S P S P E F V Q A M S S L V V A G F P

201 GATAGGCGGCATCITTTGGTGCATTTGTTGGCGGATCTGTATCAAAATAAAATGGGGCGAAAGCTGTCTCPTTTTATCTTTAACAATTCGGATGGCCGTTC 100
I G G I F G A L F G G S V S N K M G R K L S L F I F N I P M A V G

301 TCCCTCCTAAATGATGGCTTGTACAGGACGGTTAGTTTGAATGATTTATCGTTGGTAGAGTGCPTGTGGATTTCGCTGTTGGTGCCTTCACIGGTATAG 133
S L L M M A C Q A A V S F E M I I V G R V L V G F A C G A F T G I

401 CACCAGTATATCTCGCAGAAATCGCCCGAGTCAGGATTCGTTGGTATGTTCGGGATAAATGACCAATTCGGCCATTCGCTGTCGCCATTTCAATTTCTCAAAT 167
A P V Y L A E I A P V R I R G M S G I M H O L A I V C A I L L I S Q I

501 CCTTGGGTGGAAGGAATTAATGGGGTCGGCAAACCTTCGCTTCCTTCGCTTCGCAATCAACCTTCGGTTCGCTTCCTATTTATCTCTATTTGGATT 200
L G L K E L M G S A K L W P Y L L G L T I I P S V V L L F L F W I

601 TGTCCAGACAGCCCCCTTACATTTCTACIGAAATAGTCAGGATCTTCGAGAGTTCGAAATTCGCCCCITTTTGGCTCCGAGGCGATACCGAAGTCGTTGAG 233
C P D S P R Y I L L N S Q D L E S A K S A L F W L R G D T E V V E

701 AGGAGATCCGGGAGCTCTTGGCTGAACAAGAGAACGAAAGCGAAATCATACTAAATTCGCCCTGAAAGACCTCTTCGCTGTCAAAGCTTCGCTTTGGC 267
E E I G E L L A E Q E N E S E N H T K F P L K D L F R V K A L R L A

801 TCTCTCGTCCCGTTGTAGCCCATTCGGCCCAACAGTTTTCGGAAATAAATGCTGCTCTCTCTACTCCACTTCGCTATTTGAAAGCATTCGGCTCACC 300
L F V A V V A H L A Q Q F S G I N A A L F E Y S T S L F E S I G L T

901 TCACAGGCGGTACCGGACITTTGGTGTGGGCTCGATGATGTCGTCATCACCTGTCGCTTCCTATTTGAAAGAGTTCGGTCCGGGATCCTTC 333
S Q A V Y A T L G V G S M I V V I T V A S J F L I E R V G R R I L

1001 TTATAGGCGGTCCTCAGTGTATGCTTTTCAGCGCCGTCATCATCACCATTCGGCTTCGCTTCGCGAGCCATGCCTTCGGCCITGTCCTACCTTCGCATCAC 367
L I G G L S V M L F S A V I I T I G L A L R S H A S G L V Y L A I T

1101 TTTTGTCTACATCTTCGTTGGTGGTTTCGCTATCGGACCGGCTCAATCCCGTGGTTTGTGGTGGCTGAGATGTTTGTGCGAGAGACAGTGATCCTTCGC 400
F V Y I F V G G F A I G P G S I P W F V V A E M F V Q E T R D P A

1201 ATTGTGATCACAGTTCATCGTCAATTTGGCTCGCTCAAAATGTTATCAGCCTGGGATAATCCCGCTTTTGAAGTACCTAAAGGACTACTCCTTCATGCGGT 433
I V I T V I V N W L A Q I V I S L G Y P P L L K Y L K D Y S E M P

1301 TCATTCGGCTTCGTTGGTATCTTCATTCGCCCTGCTCTACTTCTTCCTGCCAGAGACGAAGGGCCGAGCGCCITGTGATGTCAGGATGAGTTTGTGGCAT 467
F I G L L V I F I A L L Y F F L P E T K G R A P C D V Q D E F V R M

1401 GACCGGCGGCGAGAGGACGACCTCACCCCTCGGCTCCTACACTCGCTCCCTCCTAGTGAAGTGGCGAAAATATGACGAAATCCGATAGGGTCAAATTC 500
T G G A E D D V T L G S Y T R S L P S E N G E N M T K S D R V K F

1501 TAGCGCCCTTCCT

1601 GGACAGATTTCACIGACITTAATAAAGTACTTGATATGACAAAAA 1723

Fig. 17. Secuencia de nucleótidos de la clona completa de cDNA (1723pb) y secuencia de aminoácidos deducida de TGIP2 (500 aa). El codón de iniciación (ATG) y el de terminación (TAG) se muestran en letras oscuras. Las 12 regiones potenciales de α -hélices transmembranales se muestran subrayadas.

PETKGR características de las GTPs. Los análisis hidropáticos y de estructura secundaria demuestran que se trata de una proteína con 12 segmentos de α -hélices asociadas a membrana, lo cual concuerda con las características descritas para los transportadores de glucosa (Fig. 18). Además, presenta homología significativa con transportadores facilitadores de glucosa. Su secuencia de aminoácidos muestra un 51-54% de similitud con los transportadores de glucosa humanos y un 43-56% con los transportadores del *S. mansoni* (Tabla I y Fig. 19). La mayor similitud con uno de los transportadores de *S. mansoni* (SGTP2) sugiere que se trata de su proteína homóloga en *T. solium* por lo que decidimos designarla como TGTP2. Las clonas 8 y 20 fueron secuenciadas parcialmente en el extremo amino-terminal de la proteína y presentan un 100% de homología con la clona 17.

La secuencia de aminoácidos de TGTP2 carece del sitio potencial de N-glicosilación (**Asn-Xaa-Ser/thr**) en el segmento extracelular entre los fragmentos que atraviesan la membrana M1 y M2 presente en la mayoría de las GTPs de eucariotas descritos (Fig. 20). Otros tres sitios muestran secuencias consenso de glicosilación (aa 246: NES; aa 250: NHT; aa 491: NMT). Sin embargo, se sabe que ninguno de estos sitios se glicosila puesto que se encuentran expuestos hacia la cara interna de la membrana plasmática. Estas proteínas están dispuestas en la membrana con sus extremos amino y carboxilo terminales hacia el citoplasma de las células (Muckler et al., 1985; Davies et al., 1987; Walmsley, 1988).

Las otras clonas parecen tratarse de insertos con defectos en su secuencia (Fig. 21). Por ejemplo, la clona 1 carece de 73 y 84 nucleótidos en la posición 336 a partir del codón de iniciación ATG con respecto a las clonas 17 y 18, respectivamente. En la secuencia de aminoácidos la carencia de esta región hace desaparecer la cuarta región transmembranal. Asimismo, en esta región, la clona 18 tiene 11 aminoácidos más con respecto a la clona 17 de *T. solium*, GLUT1 y SGTPs; la presencia y composición de estos aminoácidos hace que se pierda

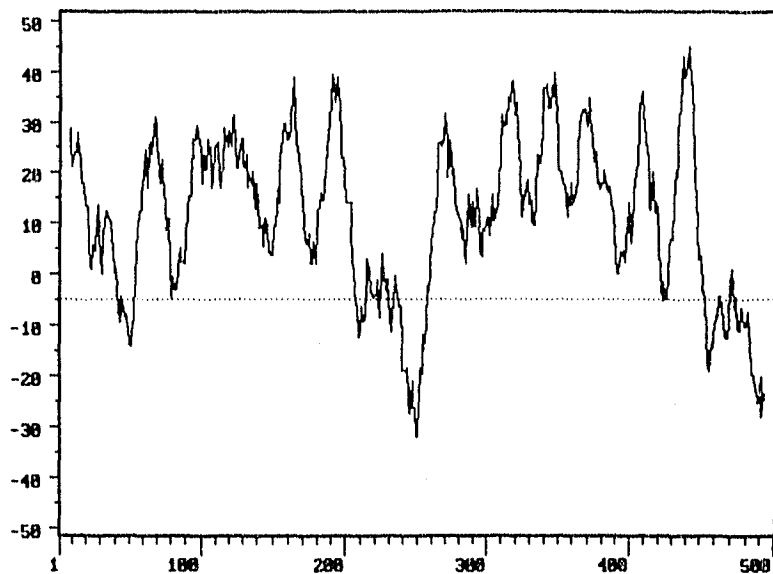


Fig. 18. Perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos de TGTP2. El perfil fue derivado de acuerdo al algoritmo de Kyte y Doolittle (1982), usando una ventana de 15 aminoácidos (realizado con el programa de PC/Gene, Inteligenetics, Inc).

Tabla I. Comparación de la estructura primaria de TGTP2 con otros transportadores de glucosa.

TGTP2	IDENTIDAD*	SIMILITUD*	No. de aminoácidos
GTUT1	36.8%	52.2%	492
GLUT3	36.7%	54.2%	496
GLUT4	35.0%	51.7%	509
SGTP1	27.1%	43.8%	521
SGTP2	41.5%	55.6%	489
SGTP4	28.1%	48.3%	505

* La identidad se refiere al caso de aminoácidos idénticos entre las secuencias. La similitud toma en cuenta los cambios que conservan las características fisicoquímicas del aminoácido (L:I:V:M; Q:N:D:E; K:R; F:Y).

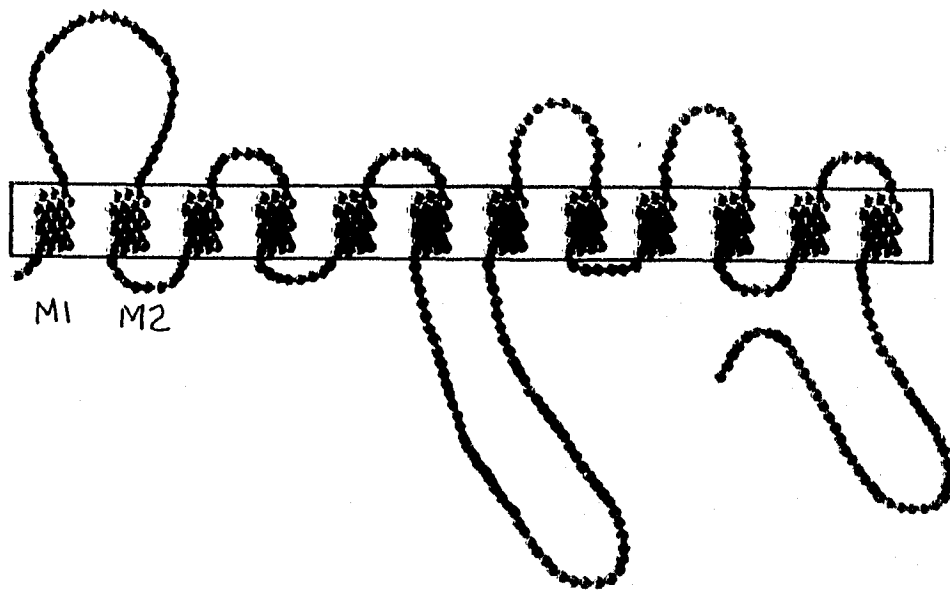


Fig. 20. Representación esquemática del trasportador de glucosa TGTP2 en la membrana plasmática (basado en el modelo de orientación de GLUT1 propuesto por Mueckler et al., 1985).

la misma región transmembranal que en la clona 1. Además, la clona 18 carece de 81 nucleótidos en la región carboxilo-terminal lo cual hace desaparecer la última región transmembranal. En cada uno de los lugares donde se encuentran las alteraciones en las secuencias, se rompe el marco abierto de lectura el cual es retomado en otra fase. Estas modificaciones en las clonas 1 y 18 pudieran ser errores ocurridos al duplicarse el fago lambda recombinante o en el procesamiento del mRNA durante la síntesis del cDNA.

```

Clona 17 AGAATTGCGCGCCGGTTTTCAATTGGAACCGTATGGAATCTGCTGTGATTTGTCTCACATAAAATGGTTAACITCCACTACGTAATCGCTACAGTGGTG
Clona 18 T.....
Clona 1 .....C.....C.....

Clona 17 ATTGTAATTTGGCTCTTCATTTTCAGTTCCGGTTTTCAAACCGGAGTTATTAAATAGTCCCTCTCCCGCTAAATCGAAAAATACATCCTAAGCATATGTGAGGACA
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 GAGGCAGTTCCACCTTCACAAGAGTTTCAGTTCAGGCAAIGAGCAGCCTCGTTCGTTGCTGGCTTTCCGATAGGCGGCATCTTTGGTGCATTTGTTGGCGGATC
Clona 18 .....C.....
Clona 1 .....C.....

Clona 17 TGTATCAAATAAAATGGGGCGAAAGCTGCTCTCTTTTATCTTTAACATTTCCGATGGCCGTTGGATCCCTCCTAATGATGGCTTTGTCAGGCAGCGGTAGT
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TTGAAATGATTATCGTTGGTAGAGTGTCTTTGATTTGGCTTGTGGT-----GCCTTCACITGGTATAGCA
Clona 18 .....GAGGAGTTGTCACCTTCTTACCATTACATTAGGT.....
Clona 1 -----

Clona 17 CCAATATATCTCGCAGAAATGCCCCAGTCAGGATTCGTGGTATGTCGGGGATAATGCACCAATTTGGCCATTTGCTGTGCCATTTCAAATTTCTCAAATCC
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TTGGGTGGAAGGAATTAATGGGGTCGGCAAAACCTGCGCTTATCTCTCCGGCCAGCAATCATACCCCTGGTCTCTTATTTATTTCCATTTTGGATTTG
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TCCAGACAGCCCCGTTTACATTTCTACTGAATAGTCAGGATCTTCGAGAGTGCAGAAATCTGCCCTTTTTTGGCTCCGAGGGGATACCGAAGTCGTTGAAGAG
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 GAGATCGGGAGCTCTTGGCTGAACAAGAGAACGAAAGCGAAAATCATACTAAATTTCCCTCGAAAGACCTCTTTCTGTGCAAAAGCTCTGCGTTTGGCTC
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TCTTCGTCCCGTTGTAGCTCACITGGCCCAACACGCAAAACCGAGAGAGAGCAGCGGCAACATCGAGTGAACCGGGTTGTGTTTTCGGAAATAAATGCTGC
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TCTCTCTACTCCACTTCGCTATTTGAAAGCATTTGGGCTCACCTCACAGGCGGTGACGCGACTTTGGGTGTGGGCTCGATGATTTGCTCATCACTGTG
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 GCTTCCATCTTCCPTATTTGAACGAGTTGGTCCGGGATCCPTCTTATAGGGGGTCTCAGTGTCAITGCTTTTCAGCGCCGTCATCATCACCATCGGCTTGG
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 CTCCTCGCAGCCATGCCCTCTGGCTTGTCTACCTTCCCATCACTTTTGTCTACATCTTCGTTGGTGGTTTCGCTATTCGGACCGGGCTCAATCCCGTGGTT
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TGTGGTGGCTGAGATGTTTGTCCAGGAGACAGTGATCCITGCCATTTGTGATCACAGTCAATCGTCAATTTGGCTCGCTCAAATTTGTTATCAGCCITGGGATAT
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 CCTCCGCTTTTGAAGTACCTAAAGGACTACTCCTTCATGCCGTTTCAATTTGGCCCTTGTGGTGTCTTCATTTGCCCTGCTCTACTTCTTCCGTCAGAGACGA
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 AGGGCCGAGCGCCTTGTGATGTGAGGATGAGTTTGTGCGCATGACCGGGCGGCAGAGGAACGCTCACCCCTCGGCTCCTACACTCGCTCCCTTCCITAG
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TGAGAATGGCGAAAATATGACGAAATCCGATAGGGTCAAATTTCTAGGCCCTTTCCCTCTCTCCCTCTCACCTCATCAAATGTAGTTTPTATCGCGTGACC
Clona 18 .....
Clona 1 .....

Clona 17 TTGTCTCTTTGGAGTCAITGTTCTATTTTCATATATTTTTTCTCGACAGATTTACTGACTTTAATAAAGTACTTTGATATGACAAAAAATAAAAAAAAAA
Clona 18 .....
Clona 1 .....TGCC.....

```

Fig. 21. Alineación de la secuencia de nucleótidos de las clonas 1, 17 y 18. Nucleótidos idénticos: (.); deleciones: (-).

V. DISCUSIÓN

Los estudios de caracterización de la FGp mejoraron la resolución de las glicoproteínas contenidas en la FGp con respecto a lo descrito anteriormente por Landa et al, (1988). El mejoramiento en la detección de nuevas glicoproteínas se debe al uso de lectinas en el sistema revelador principalmente. Con el sistema usado en la presente tesis se detectaron hasta 22 bandas, versus 8 bandas observadas por tinción de PAS en las fracciones de cisticercos de *T. solium* (Landa et al., 1994) y de otros metacéstodos ciclofilídeos (Knowles y Oaks, 1979; Mills et al., 1984). Por ejemplo la tinción de PAS en la región de alto peso molecular muestra una sola banda difusa mientras que la tinción con lectinas permite observar 8 glicoproteínas, confirmando la idea de que se trata de un conjunto de glicoproteínas con pesos moleculares entre 150-200 kDa. Otro ejemplo es la demostración de tres glicoproteínas en la región del gel denominada anteriormente como Gp2-3. Además estas proteínas son algunas de las más abundantes en la FGp lo que correlaciona con lo descrito anteriormente tanto para *T. solium*, como para otros ténidos (Landa, 1984; Lamsam y McManus, 1990).

Como era de esperarse el tratamiento de las glicoproteínas en la fracción FGp con metaperyodato de sodio abate la unión de las lectinas. Se había sugerido que algunas proteínas contenidas en la fracción FGp no son glicoproteínas con especificidad hacia Con A. En el presente trabajo se confirmó la presencia de pequeñas cantidades de AgB en la FGp. El AgB de *T. solium* ha sido identificado como paramiosina, una proteína estructural del músculo de invertebrados. Su presencia en la FGp se debe posiblemente a la unión con alguna glicoproteína que se une a Con A. Los ensayos de reconocimiento del AgB por anticuerpos α -Gp1 sugieren una asociación con Gp1 (Fig. 6). Otra glicoproteína de 55 kDa inicialmente identificada como Gp6 de la FGp resultó ser la cadena pesada de la IgG de cerdo (Landa et al., 1994). La presencia de inmunoglobulinas del huésped sobre la superficie de

cisticercos de *T. solium* ha sido reportada previamente (Willms y Arcos, 1977).

En un intento por aislar clonas de cDNA conteniendo la secuencia codificadora de algunas glicoproteínas del cisticerco de *T. solium*, se siguieron tres estrategias. La primer estrategia consistió en la purificación de una o varias de las glicoproteínas para su posterior secuenciación parcial (~ 15 aminoácidos). A partir de esta secuencia se pueden diseñar y sintetizar oligonucleótidos para usarlos como sondas en el tamizaje de las bibliotecas del cisticerco. Esta estrategia ya había sido seguida con éxito para la clonación del cDNA que codifica para el AgB del cisticerco de *T. solium* (Landa et al.; 1993). En el caso de las glicoproteínas de la FGp, se logró obtener una secuencia parcial, poco clara, de la Gp88. Los análisis mostraban una aparente mezcla de secuencias. Sin embargo, se sintetizaron los oligonucleótidos degenerados correspondientes a la secuencia más intensa y se tamizaron las bibliotecas, sin lograr el marcaje de ninguna placa. Con respecto a la Gp180-200 (correspondiente a la Gp1 de Landa et al., 1994), los intentos de secuenciación fueron infructuosos incluso después de digestiones parciales para obtener péptidos de la glicoproteína (Landa, comunicación personal). Los anteriores intentos indicaron que la complejidad de las proteínas purificadas por unión a Con A es mayor de lo esperado e hicieron dirigir los esfuerzos en otra dirección.

La segunda estrategia, fue la utilización de los anticuerpos dirigidos en contra de las glicoproteínas para el tamizaje de bibliotecas de expresión. En el laboratorio se dispone de anticuerpos policlonales inducidos por la glicoproteína de 180 kDa denominada Gp1. Los experimentos de Western blot con los anticuerpos α -Gp1 antes y después de tratamiento de la proteína con metaperiodato mostraron que los anticuerpos reconocen la fracción proteica. Para el tamizaje de las bibliotecas se preadsorbieron los anticuerpos contra antígenos de *E. coli* obteniéndose una remoción de los anticuerpos inespecíficos.

Desafortunadamente, no se obtuvo un reconocimiento claro que permitiera aislar clonas para Gp1. Sin embargo, no se considera que el enfoque haya sido fallido. El abandono de esta estrategia pudo ser la causa de este resultado, por lo que debe explorarse mejor reintentando el tamizaje con los anticuerpos.

La tercera estrategia, que resultó muy productiva, consistió en la búsqueda de proteínas de superficie aprovechando su similitud en la secuencia de aminoácidos con proteínas homólogas descritas en otros organismos. En el presente trabajo se logró la clonación y secuenciación del cDNA de una proteína con homología hacia transportadores facilitadores de glucosa (GTPs). Además, la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos muestra las características de este tipo de transportadores descritos hasta el momento. Contiene 12 regiones potenciales de α -hélices transmembranales, donde el tamaño de las asas que se forman entre cada segmento transmembranal se correlacionan con los descritos en otros miembros de esta familia. Además, contiene la secuencia conservada GR(R/K) después del segundo y el octavo segmento transmembranal y las secuencias PESPR y PETKGR después del sexto y doceavo segmento, respectivamente. Dada su mayor similitud con el transportador de *S. mansoni* denominado SGTP2, decidimos designarla TGTP2. La TGTP2 es la primera proteína secuenciada en céstodos con características de GTPs. En *S. mansoni* se han caracterizado molecularmente tres transportadores de glucosa (SGTP1, SGTP2 y SGTP4). SGTP1 y SGTP4 se encuentran en el tegumento de la cercaria y del parásito adulto. El otro ha sido poco caracterizado y parece encontrarse en los huevecillos (Skelly et al., 1994; Zhong et al., 1995; Shoemaker, comunicación personal).

Además de los estudios reportados en *S. mansoni* y, ahora en *T. solium*, la caracterización de estas proteínas en parásitos ha avanzado en diversos protozoarios del género *Leishmania* y *Trypanosoma* (Langford et al., 1992; Stack et al., 1990; Bringaud y Baltz, 1992; Teteaud et al., 1994). Algunas de las proteínas se expresan diferencialmente durante el ciclo de vida de estos

parásitos (Cairns et al., 1989; Bringaud y Baltz, 1992; Bringaud y Baltz, 1993).

Otra característica de la mayoría de las GTPs es la presencia de un sitio único de N-glicosilación en la asa externa entre el primer y segundo segmento transmembranal. Sin embargo, en la secuencia de aminoácidos de TGTP2 no se encuentra este sitio de glicosilación. La ausencia de este sitio ha sido reportada también en transportadores de glucosa de *Leishmania enriettii* y *Chlorella kessleri* (Stack et al., 1990; Langford et al., 1994; Langford et al., 1995; Piper et al., 1995; Sauer y Tanner, 1989; Stadler et al., 1995). La ausencia de glicosilación en TGTP2, en caso de localizarse en la superficie del parásito en contacto con su huésped, podría relacionarse con la evasión del ataque inmune. Existen varios estudios acerca del papel del residuo carbohidrato en la función de transportadores de humanos. Por ejemplo se ha mostrado que el tratamiento de liposomas cargados con el transportador de eritrocitos (GLUT1), con distintas exo y endo- glicosidasas, disminuye el transporte de glucosa (Feugeas et al., 1991). Además, la eliminación del sitio de glicosilación en la primer asa externa de GLUT1, producida por métodos de mutagénesis dirigida, aumenta 2-2.5 veces la Km del transporte (Asano et al., 1991). Es claro que a pesar de que el residuo carbohidrato influye en la actividad de transporte, su ausencia no abate por completo la funcionalidad de la fracción proteica. Por lo tanto, es concebible que los transportadores no glicosilados, expuestos a la interfase huésped-cisticercos pueden disminuir el reconocimiento del huésped y todavía mantener niveles funcionales útiles para el parásito, en un medio (los tejidos del huésped humano o porcino) rico en glucosa.

Las proteínas de la familia de los transportadores de glucosa poseen diferencias significativas en el tamaño y composición de aminoácidos de la asa que se forma entre los dos primeros segmentos transmembranales, así como en la secuencia de los extremos amino y carboxilo terminales (Fukumoto et al., 1988; Langford et al., 1992; James y Piper, 1993). En este respecto, la

secuencia del carboxilo terminal ha sido la más utilizada para la producción de anticuerpos para estudios de localización (Haspel et al., 1988; Zhong et al., 1995; Langford et al., 1995). Hasta la fecha hemos obtenido anticuerpos de conejo en contra de un péptido sintético diseñado a partir de la secuencia carboxilo terminal de TGTP2. Actualmente, se llevan a cabo los ensayos de localización en el tejido de los cisticercos.

Una razonable comprensión del sistema de transporte de carbohidratos en el cisticerco de *T. solium*, nos ayudará a entender mejor la dependencia metabólica del cisticerco por su huésped, así como sus mecanismos de adaptación a los cambios en la concentración de nutrientes en su huésped. Esta información puede eventualmente ser la base de tratamientos farmacológicos o inmunológicos en contra del parásito, que exploten las diferencias entre los sistemas de ambos organismos.

Para el proyecto de doctorado, pretendemos la caracterización molecular y bioquímica del sistema de internalización por facilitadores en el cisticerco de *T. solium*. Inicialmente, intentaremos determinar si existen algunos otros transportadores de glucosa en el tegumento del cisticerco. Hasta el momento, hemos clonado y secuenciado otra proteína con homología hacia SGTP1 del *S. mansoni*.

VI. APÉNDICE.

A. TRANSPORTE DE GLUCOSA.

La glucosa es la mayor fuente de energía metabólica de muchos tipos celulares. En paralelo a la gran utilización de glucosa como nutriente, una variedad de mecanismos se han desarrollado para catalizar la captación de esas moléculas hidrofílicas a través de la membrana plasmática. En mamíferos, donde los complejos mecanismos homeostáticos mantienen los niveles de glucosa en sangre rigurosamente constantes, muchas células contienen sistemas de difusión facilitada para la captación de glucosa. En este sistema, el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática se lleva a cabo sin gasto de energía metabólica y a favor de un gradiente de concentración. No obstante, transportadores activos dependientes de sodio son encontrados en la membrana plasmática apical de las células epiteliales del intestino y del riñón. Este sistema de transporte explota el gradiente electroquímico de iones Na^+ (ej. vertebrados) o H^+ (ej. protozoarios, bacterias) a través de la membrana plasmática.

B. CARACTERÍSTICA DE LA FAMILIA GLUT.

La difusión facilitada es el mecanismo de captación de glucosa de monosacáridos (glucosa, galactosa y fructosa) más ampliamente utilizado. Las proteínas encargadas de esta función pertenecen a una superfamilia cuyos miembros difieren en el detalle requerido para conferir selectividad y especificidad, pero no en el aspecto de su estructura (Marger y Saier, 1993). En el humano, el transporte facilitado de glucosa esta mediado por los miembros de la familia de proteínas GLUT. Hasta el momento, se han descrito seis miembros de esta familia (Mueckler, 1994). Estas proteínas están expresadas de una manera específica en células y tejidos, y exhiben distintas cinéticas y propiedades regulatorias que reflejan su papel funcional específico (Baldwin, 1993). Cada uno de los transportadores fue numerado en orden a su

descubrimiento. El primero, **GLUT1**, es ampliamente expresado y se piensa que provee a las muchas células de sus requerimientos basales de glucosa. También juega un papel especial en el transporte de glucosa a través de la barrera endotelial en los tejidos. **GLUT2** aparece en órganos que liberan glucosa a la sangre tales como el intestino, el hígado y el riñón. Esta proteína está también presente en las células betas de los islotes de Langerhans del páncrea, donde dada su elevada Km puede estar actuando como sensor del incremento de glucosa para la secreción de insulina. **GLUT3** es encontrada en el cerebro y se considera como el transportador de glucosa de las células neuronales. **GLUT4** es expresado exclusivamente en los adipocitos, células musculares y corazón donde el transporte de glucosa es regulado por insulina. Es el responsable de disponer de la glucosa incrementada en los tejidos después de la ingesta de comida (estado posprandial) y es importante en la homeostasis de glucosa por el cuerpo. **GLUT5** es un transportador de fructosa que es abundante en los espermatozoides y en la membrana apical de las células intestinales. **GLUT7** es el transportador en la membrana del retículo endoplásmico que permite el flujo de glucosa libre fuera del lumen de este organelo después de la acción de la glucosa 6-fosfatasa sobre la glucosa 6-fosfato.

C. ESTRUCTURA DE LOS TRANSPORTADORES.

Los transportadores facilitadores de glucosa son glicoproteínas integrales de membrana que exhiben un tamaño molecular promedio de 55 kDa. Estas proteínas pertenecen a una familia de proteínas de membrana estructuralmente relacionadas. Análisis hidropáticos y de estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos predicha para la GLUT1 humana revelaron que esta proteína es altamente hidrofóbica y sugirieron que aproximadamente el 50% de la proteína se localiza entre la bicapa lipídica. Basados en estos análisis, Mueckler et al. (1985), propusieron un modelo de orientación en la membrana plasmática para GLUT1, en el cual la proteína atraviesa la membrana 12 veces

y, sus extremos amino y carboxilo quedan orientados hacia el interior de la célula. Con excepción del segmento extracelular que conecta los dominios transmembranales M1 y M2, y del segmento intracelular muy hidrofílico que une M6 y M7, los demás dominios transmembranales se encuentran unidos por regiones cortas de 7-14 aminoácidos (Fig. 22). Esta estructura ha sido confirmada por digestión proteolítica vectorial y estudios de unión de anticuerpos específicos de secuencia (Mueckler et al., 1985; Davies et al., 1987; Haspel et al., 1988). Todos los miembros de esta familia de proteínas mantienen las características descritas en este modelo.

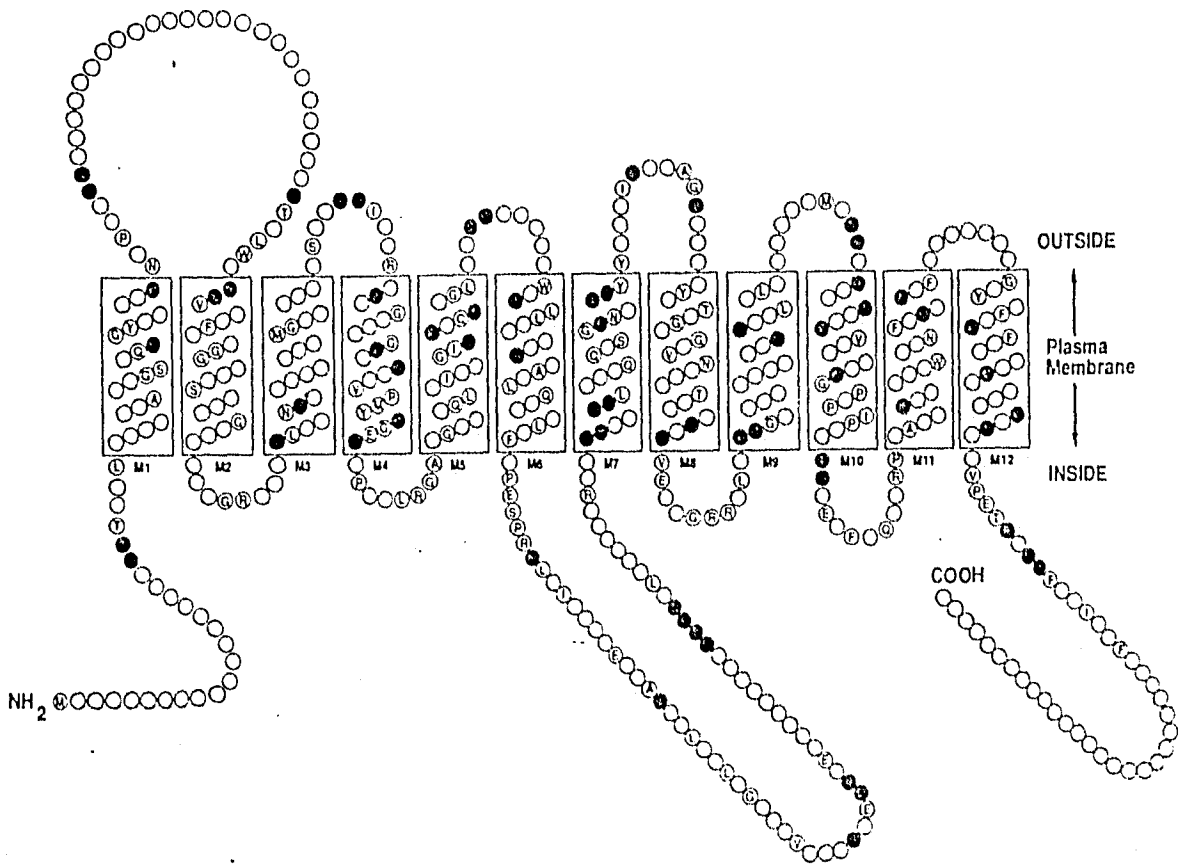


Fig. 22. Modelo de orientación en la membrana plasmática de GLUT1. Las 12 regiones de α-hélice transmembranales son mostradas como cajas y están numeradas de M1 a M12 (tomado de Gould y Bell, 1990).

TABLA II. Los transportadores de la familia GLUT.

DESIGNACIÓN	PM (kDa) ^a (n ^o residuos)	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA ^a	Km (mM) ^b
GLUT1	54.1 (492)	1	17
GLUT2	57.0 (524)	3	42
GLUT3	53.9 (496)	12	11
GLUT4	54.7 (509)	17	2
GLUT5	54.9 (501)	1	N.D.
GLUT7	53.0 (528)	N.D.	N.D.

^a Los valores de PM, número de residuos de aminoácidos y localización cromosómica de los genes están dados para los transportadores humanos, excepto para GLUT7 donde se indican los valores de la proteína de rata.

^b Los valores de Km para el intercambio en equilibrio de 3-O-metilglucosa fueron determinados para cada proteína expresadas en oocitos de *Xenopus* (tomado de Baldwin, 1993).

N.D. significa "no determinado".

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Aluja, A.; Escobar, A.; Escobedo, F.; Flisser, A.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Madrazo, I.; Velázquez, Willms, K. "Cisticercosis: una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*". Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura Económica. México, 1987.

Aluja, A. y Vargas, G. "La histopatología de la cisticercosis porcina". En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa, México, 147-155, 1989.

Asano, T.; Katagiri, H.; Takata, K.; Lin, J.; Ishihara, H.; Inukai, K.; Tsukuda, K.; Kikuchi, M.; Hirano, H.; Yazaki, Y.; Oka, Y. "The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity". The Journal of Biological Chemistry 266(36): 24632-24636, 1991.

Baldwin, S. "Mammalian passive glucose transporters: members of a ubiquitous family of active and passive transport proteins". Biochimica et Biophysica Acta 1154: 17-49, 1993.

Bause, E. "Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes". Biochem. J. 209: 331-336, 1983.

Benton, D. and Davis, R. "Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ". Science, 18:180-182, 1977.

Bringaud, F. and Baltz, T. "Differential regulation of two distinct families of glucose transporter genes in *Trypanosoma brucei*". Mol. Biol. Paras. 52: 111-122, 1992.

Bringaud, F. and Baltz, T. "A potential hexose transporter gene expressed predominantly in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*". Molecular and Cellular Biology 13(2): 1146-1154, 1993.

Cairns, B.; Collard, M.; Landfear, S. "Developmentally regulated gene from *Leishmania* encodes a putative membrane transport protein". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 7682-7686, 1989.

Celenza, J.; Marshall-Carlson, L.; Carlson, M. "The yeast *SNF3* gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2130-2134, 1988.

Correa, D. "Elementos del sistema inmunológico en la superficie de cisticercos extirpados del ser humano". Tesis de Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 1982.

Correa, D.; Laclette, J.P.; Rodríguez-del-Rosal, E.; Merchant, M.; Flisser, A. "Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs". *The Journal of Parasitology* 73(2): 443-445, 1987.

Correa, D.; Tovar, A.; Espinoza, B.; Plancarte, A.; Flisser, A. "Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parásito". En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa, México, 31-43, 1989.

Davies, A.; Meeran, K.; Cairns, M.; Baldwin, S. "Peptide-specific antibodies as probe of the orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane". *The Journal of Biological Chemistry* 262(19): 9347-9352, 1987.

Eisenberg, D.; Schwarz, E.; Komaromy, M.; Wall, R. "Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot". *J. Mol. Biol.* 179: 125-142, 1984.

Escobar-Izquierdo, A. "Patología de la neurocisticercosis" En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa, México, 89-95, 1989.

Feldman, M.; Plancarte, A.; Sandoval, M.; Wilson, M.; Flisser, A. "Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 559-562, 1990.

Feugeas, J.; Néel, D.; Goussault, Y.; Derappe, C. "Glycosylation of the human erythrocyte glucose transporter: a minimum structure is required for glucose transport activity". *Biochimica et Biophysica Acta* 1066: 59-62, 1991.

Flisser, A.; Plancarte, A.; Correa, D. "*Taenia solium* cysticercosis: a review". *Research and Reviews in Parasitology* 51(1-4): 17-23, 1991.

Fukumoto, H.; Seino, S.; Imura, H.; Seino, Y.; Eddy, R.; Fukushima, Y.; Byers, M.; Shows, T.; Bell, G. "Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5434-5438, 1988.

Gould, G. and Bell, G. "Facilitative glucose transporters: an expanding family" *TIBS* 15: 19-23, 1990.

Grogl, M.; Estrada, J.J.; MacDonald, G.; Kuhn, R.E. "Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis". *The Journal of Parasitology* 71(4): 433-442, 1985.

Hammerberg, B., Dangler, C., Williams, J. "Taenia taeniaeformis: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades". *Journal of Parasitology* 66: 569-576, 1980.

Haspel, H.; Rosenfeld, M.; Rosen, O. "Characterization of antisera to a synthetic carboxyl-terminal peptide of the glucose transporter protein". *The Journal of Biological Chemistry* 263(1): 398-403, 1988.

Hawkes, R. "Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting". *Analytical Biochemistry* 123: 143-146, 1982.

Herrera, L.; Santiago, P.; Rojas, G.; Salazar, P.; Tato, P.; Molinari, J.L.; Schiffmann, D.; Ostrosky-Wegman, P. "Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode". *Mutation Research* 305: 223-228, 1994.

Hipkiss, J.B.; Branford-White, C.J.; Peters, T.J. "Effect of phenothiazine on *Hymenolepis diminuta* with special reference to the brush border Ca²⁺-dependent ATPase". *Molecular and Biochemical Parasitology* 22: 55-63, 1987.

James, D. and Piper, R. "Targeting of mammalian glucose transporters". *Journal of Cell Science* 104: 607-612, 1993.

Joshua, G.W.P.; Harrison, L.J.S.; Sewell, M.M.H. "Developmental changes in proteins and glycoproteins revealed by radioiodination of viable *Taenia saginata* larvae". *Parasitology* 99: 255-274, 1989.

Kayano, T.; Burant, C.; Fukumoto, H.; Gould, G.; Fan, Y.; Eddy, R.; Byers, M.; Shows, T.; Seino, S.; Bell, G. "Human facilitative glucose transporters". *The Journal of Biological Chemistry* 265(22): 13276-13282, 1990.

Knowles, W.J. and Oaks, A. "Isolation and partial biochemical characterization of the brush border plasma membrane from the cestode, *Hymenolepis diminuta*". *The Journal of Parasitology* 65(5): 715-731, 1979.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein". *J. Mol. Biol.* 157: 105-135, 1982.

Laclette, J.P.; Ornelas, Y.; Merchant, M.T.; Willms, K. "Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs". In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, Inc. New York, 375-387, 1982.

- Laclette, J.P.; Merchant, M.T.; Willms, K.** "Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*". *The Journal of Parasitology* 73(1): 121-129, 1987.
- Laclette, J.P.; Shoemaker, C.; Richter, D.; Arcos, L.; Pante, N.; Cohen, C.; Bing, D.; Nicholson-Weller, A.** "Paramyosin inhibits complement C1". *The Journal of Immunology* 148(1): 124-128, 1992.
- Laemmli, U.K.** "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227: 680- , 1970.
- Lamsam, S. and McManus, D.P.** "Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of *Taenia crassiceps*". *Parasitology* 101: 115-125, 1990.
- Landa, A.** "Estudio de las glicoproteínas del cisticerco de la *Taenia solium*". Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 1984.
- Landa, A.** "Estudio de las glicoproteínas de superficie del cisticerco de la *Taenia solium*". Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, 1988.
- Landa, A.; Laclette, J.P.; Nicholson-Weller, A.; Shoemaker, C.B.** "cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB)". *Molecular and Biochemical Parasitology* 60: 343-348, 1993.
- Landa, A.; Merchant, M.T.; Willms, K.; Laclette, J.P.** "Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *Taenia solium* (Cestoda) cysticerci". *International Journal for Parasitology* 24(2): 265-269, 1994.
- Langford, C.; Ewbank, S.; Hanson, S.; Ullman, B.; Landfear, S.** "Molecular characterization of two genes encoding members of the glucose transporter superfamily in the parasitic protozoan *Leishmania donovani*". *Mol. Biol. Paras.* 55: 51-64, 1992.
- Langford, C.; Little, B.; Kavanaugh, M.P.; Landfear, S.** "Functional expression of two glucose transporter isoforms from the parasitic protozoan *Leishmania enriettii*". *The journal of Biological Chemistry* 269(27): 17939-17943, 1994.
- Langford, C.; Kavanaugh, M.; Stenberg, P.; Drew, M.; Zhang, W.; Landfear, S.** "Functional expression and subcellular localization of a high- K_m hexose transporter from *Leishmania donovani*". *Biochemistry* 34: 11814-11821, 1995.
- Leducq, R. and Gabrion, C.** "Developmental changes of *Echinococcus multilocularis* metacestodes revealed by tegumental ultrastructure and lectin-binding sites". *Parasitology* 104 Pt 1P: 129-141, 1992.

- Leid, R.W., Suquet, C.M., Perryman, L.E.** "Inhibition of antigen- and lectin-induced proliferation of rat spleen cells by a *T. taeniaeformis* proteinase inhibitor". *Clinical and Experimental Immunology* 57: 187-194, 1984.
- Leid, R.W. and Suquet, C.M.** "A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*". *Molecular and Biochemical Parasitology* 18: 301-311, 1986.
- Leid, R.W.; Suquet, C.M.; Bower, H.G.; Hinrichs, D.J.** "Interleukin inhibition by a parasite proteinase inhibitor, taeniaestatin". *The Journal of Parasitology* 137: 2700-2702, 1986.
- Leid, R.W.** "Parasites and Complement". *Advances in Parasitology* 27: 131-168, 1988.
- Lipman, D. and Pearson, W.** "Rapid and sensitive protein similarity searches". *Science* 227: 1435-1441, 1985.
- Lumsden, R.; Oaks, J.A.; Alworth, W.L.** "Cytological studies on the absorptive surfaces of cestode. IV. Localization and cytochemical properties of membrane-fixed cation binding sites". *The Journal of Parasitology* 56(4): 736-747, 1970.
- Lumsden, R.** "Cytological studies on the absorptive surfaces of cestode. VI. Cytochemical evaluation of electrostatic charge". *The Journal of Parasitology* 58(2): 229-234, 1972.
- Lumsden, R.** "Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths". *Experimental Parasitology* 37: 267-1975.
- Lumsden, R.; Voge, M.; Sogandares-Bernal, F.** "The metacestode tegument: fine structure, development, topochemistry and interaction with the host", en *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, 307-361, 1982.
- Maiden, M.; Davis, E.; Baldwin, S.; Moore, D.; Henderson, P.** "Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous". *Nature* 325: 641-643, 1987.
- Marco, M. and Nieto, A.** "Metalloproteinases in the larvae of *Echinococcus granulosus*". *International Journal of Parasitology* 21(6): 743-6, 1991.
- Marger, M. and Saier, M.** "A major family of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport". *TTBS* 18: 13-20, 1993.
- McCracken, R. and Lumsden, R.** "Structure and function of parasite surface membranes. II. Concanavalin A adsorption by the cestode

Hymenolepis diminuta and its effect on the transport".
Comparative Biochemical Physiology B Comparative Biochemistry.
52B: 331-339, 1975.

Mills, G.L.; Coley, S.C.; Williams, J.F. "Lipid and protein composition of the surface tegument from larvae of *Taenia taeniaeformis*". The Journal of Parasitology 70(2): 197-207, 1984.

Mohan, S.B. "Determination of Purity and Yield". In: Methods in Molecular Biology, Vol. 11: Practical Protein Chromatography. Kenney, A and Fowell, S. The Humana Press Inc., Totowa, N.J. 307-323, 1992.

Molinari, J.L.; Tato, P.; Reynoso, O.A.; Cazares, J.M. "Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on culture human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. Ann. Trop. Med. and Parasit. 84(3): 205-208, 1990.

Mueckler, M.; Caruso, C.; Baldwin, S.; Panico, M.; Blench, I.; Morris, H.; Allard, J.; Lienhard, G.; Lodish, H. "Sequence and structure of a human glucose transporter". Science 229: 941-945, 1985.

Mueckler, M. "Facilitative glucose transporters". Eur. J. Bioche. 219: 713-725, 1994.

Nishimura, H.; Kuzuya, H.; Kosaki, A.; Okamoto, M.; Kono, S.; Inoue, G.; Maeda, I.; Imura, H. "Monoclonal antibodies possibly recognize conformational changes in the human erythrocyte glucose transporter". Biochem. J. 281: 103-106, 1992.

Pappas, P.W. and Read, L. "Membrane transport in the helminth parasites". Experimental Parasitology 37: 469-530, 1975.

Pappas, P.W. "Activation and inhibition of the brush-border membrane-bound alkaline phosphatase activity of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) by divalent cations". Parasitology 102 Pt1P: 141-145, 1991.

Parkhouse, R. M. and Harrison, L. S. "Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia* sp. metacestodes". Parasite Immunology 9: 263-268, 1987.

Pearson, W.R. and Lipman D.J. "Improved tools for biological sequence comparison". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448, 1988.

Piper, R.; Xu, X.; Russell, D.; Little, B.; Landfear, S. "Differential targeting of two glucose transporters from *Leishmania enriettii* is mediated by an NH₂-terminal domain". The Journal of Cell Biology 128(4): 499-508, 1995.

Potter, K.A. and Leid, R.W. "Isolation and partial characterization of an eosinophil chemotactic factor from metacestodes of *Taenia taeniaefomis* (ECF-Tt)". *The Journal of Immunology* 136(5): 1712-1717, 1986.

Rabiela-Cervantes, M.T.; Rivas-Hernández, A.; Rodríguez-Ibarra, J.; Castillo-Medina, S.; Cancino, F. "Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis". In: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, 179-199, 1982.

Ramírez-Bon, E.; Merchant, M.; González-del Pliego, M.; Cañedo, L. "Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *T. solium*". In: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, 261-280, 1982.

Read, C.; Rothman, A.; Simmons, J. "Studies on membrane transport with special reference to parasite-host integration". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 113: 154-205, 1963.

Rosen, R. and Uglem, G.L. "Localization of facilitated diffusion and active glucose transport in cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda)". *International Journal for Parasitology* 18: 581-584, 1988.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. "Molecular Cloning. A laboratory manual." 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Sandeman, M. and Williams, J. "Lectin binding to cyst stages of *Taenia taeniaefomis*". *J. Parasitol.* 70: 661-667, 1984.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. "DNA sequencing with chain terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5465, 1977.

Sarciron, M.E.; Hamoud, W.; Azzar, G.; Petavy, A.F. "Alkaline phosphatase from *Echinococcus multilocularis*: purification and characterization". *Comp. Biochem. Physiol. [B]* 100(2): 253-258, 1991.

Sauer, N. and Tanner, W. "The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter". *FEBS* 259: 43-46, 1989.

Schmidt, J. and Peters, W. "Localization of glycoconjugates at the tegument of the tapeworms *Hymenolepis nana* and *H. microstoma* with gold labelled lectins". *Parasitology Research.* 73: 80-86, 1987.

Sciutto, E.; Fragoso, G.; Baca, M.; De la Cruz, V.; Lemus, L.; Lamoyi, E. "Depressed T-cell proliferation associated with

susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection". *Infection and Immunity* 63(6): 2277-2281, 1995.

Shepherd, J.C.; Aitken, A.; McManus, D.P. "A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis". *Molecular and Biochemical Parasitology* 44: 81-90, 1991.

Siebert, A.E. Jr.; Blitz, R.R.; Morita, C.T.; Good, A.H. "*Taenia crassiceps*: serum and surface immunoglobulins in metacestode infections in mice". *Experimental Parasitology* 51: 418, 1981.

Skelly, P.; Kim, J.W.; Cunningham, J.; Shoemaker, C.B. "Cloning, characterization and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*". *J. Biol. Chem.* 269(6): 4247-4253, 1994.

Smyth, J.D. "The physiology of cestode". *University Reviews in Biology*. Oliver and Boyd. 1-225, 1969.

Sogandares-Bernal, F. and Voge, M. "Immunoglobulins on the surfaces of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* Hoenppli 1925 (Cestoda), from laboratory infections of ICR mice". *Journal of Parasitology* 64: 620-624, 1978.

Sosa, A.; Giron, H.; Alva, S.; Calzada, L. "Presence and nature of a glyco-calix-like coat on the external vesicular membrane of *Cysticercus cellulosae*: a high resolution histochemical study". *Life Science* 21: 1021, 1977.

Stack, S.; Stein, D.; Landfear, S. "Structural isoforms of a membrane transport protein from *Leishmania enriettii*". *Molecular and Cellular Biology* 10(12): 6785-6790, 1990.

Stadler, R.; Wolf, K.; Hilgarth, C.; Tanner, W.; Sauer, N. "Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H⁺ symport". *Plant. Physiol.* 107(1): 33-41, 1995.

Suquet, C.M.; Green-Edwards, C.; Leid, R.W. "Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metacestode proteinase inhibitor". *International Journal of Parasitology* 14: 165-172, 1984.

Tetaud, E.; Bringaud, F.; Chabas, S.; Barrett, M.; Baltz, T. "Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8278-8282, 1994.

Threadgold, L.T. and Befus, A.D. "Hymenolepis diminuta: ultrastructural localization of immunoglobulin-binding sites on the tegument". *Experimental Parasitology* 43: 169, 1977.

- Towbin, H.; Stachelin, T.; Gorgon, J.** "Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sciences, USA 70- 4350, 1979.
- Trimble III, J.J. and Lumsden, R.D.** "Cytochemical characterization of tegument membrane-associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae". The Journal of Parasitology 61(4): 665-676, 1975.
- Tsang, V.; Brand, J.; Boyer, A.** "An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*)". Journal of Infectious Diseases 159: 50-59, 1989.
- Tsang, V. and Wilson, M.** "*Taenia solium* Cysticercosis: an under-recognized but serious public health problem". Parasitology Today 11(3): 124-126, 1995.
- von Brand, T.; McMahon, P.; Gibbs, E.; Higgins, H.** "Aerobic and anaerobic metabolism of larval and adult *Taenia taeniaeformis*. II. Hexose leakage and absorption; tissue glucose and polysaccharides". Experimental Parasitology 15: 410-429, 1964.
- Walmsley, A.** "The dynamics of the glucose transporter". TIBS 13: 226-231, 1988.
- White, A. Jr.; Molinari, J.L.; Pillai, A.; Rege, A.** "Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases". The Journal of Parasitology 78(2): 281-287, 1992.
- Willms, K. and Arcos, L.** *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Experimental Parasitology 43: 396-406, 1977.
- Willms, K.; Merchant, M.T.; Arcos, L.; Sealey, M.; Díaz, S.** "Immunopathology of cysticercosis". In: Molecules, cells and parasites in immunology. Academic Press, Inc. New York, 145-162, 1980.
- Willms, K.; Merchant, M.T.; Díaz, S.; Arcos, L.** "Host-Parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*". In: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, Inc. New York, 397-410, 1982.
- Woodward, M.P.; Young, W.W. Jr.; Bloodgood, R.A.** "Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation". Journal of Immunological Methods 78: 143-153, 1985.

Zhong C.; Skelly, P.; Cohn, R.G.; Caulfield, L.P.; Shoemaker, C.B. "Immunolocalization of a Schistosoma mansoni facilitated diffusion glucose transporter to the basal, but not the apical, membranes of the surface syncytium". Parasitology 110: 383-394, 1995.