

03081

13
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL CCH

Caracterización molecular de transportadores
de glucosa en el cisticerco de Taenia solium;
localización en el parásito y respuesta inmune
humoral en pacientes neurocisticercosos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTORA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A:

M. en I.B.B. Dayana Desirée Rodríguez Contreras

MEXICO. D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27307A

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Un pueblo ignorante es un instrumento ciego de su propia destrucción"

"Moral y luces son los polos de una República;
moral y luces son nuestras primeras necesidades"

"La educación e instrucción pública son el principio más seguro de la felicidad general y la más sólida base de la libertad de los pueblos"

Simón Bolívar

A mis Padres

A mis hermanos: Ariyuri, Wanda y Aliskair

Esta tesis fué realizada en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Juan Pedro Laclette. Se contó con una beca de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico. Además, se recibió apoyo financiero para la realización del trabajo experimental y elaboración de la tesis por parte del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADED 030361; 030321; 201429), otorgado por la Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que me brindó de poder realizar mis estudios de doctorado. Al Dr. Juan Pedro Laclette, por la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación; a los Drs. Ruy Pérez Monfort, Jaime Mas y Juan Pedro Laclette (mi comité tutorial) por sus consejos que sin lugar a duda mejoraron mi aprovechamiento académico; a los Drs. Roberto Coria Ortega, Cristina Fernández Mejía, Juan Pedro Laclette, Juan Pablo Pardo Vázquez, Gerardo Gamba Ayala, Roberto Hernández Fernández y Laura Escobar Pérez, quienes amablemente aportaron comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar la presentación de este trabajo. A los miembros de la UACPyP del CCH, por su amabilidad y eficiencia; al personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en todas sus áreas y departamentos, por brindarme un agradable ambiente de trabajo.

Al Dr. C. Shoemaker, por permitirme trabajar en su laboratorio durante mis estancias en la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard. Al Dr. Patrick Skelly, por enseñarme y ayudarme con la expresión de genes en células eucariotas, y por su paciencia con mis deficiencias del idioma. A Abraham Landa, por su ayuda y amistad durante estas estancias.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron en la elaboración de este trabajo (parte experimental, publicación, congresos y elaboración de este manuscrito). A Ismael Ramírez, por la elaboración de las tinciones citoquímicas, y su ayuda en la preparación de los cortes histológicos. A Patricia de la Torre, por su asistencia técnica en el laboratorio, y su ayuda en el mantenimiento de las células de insecto. Al Dr. Miguel Morales y a Marie T. Merchant, por la asistencia técnica en el trabajo de microscopía óptica. Al Dr. Daniel Piñero, a Mariana Mondragón y a Martín García, por el apoyo en la realización de los análisis filogenéticos. A Rafael Saavedra, por su ayuda técnica y consejos académicos. A Gerardo Arrellín, por su asistencia en el manejo de animales de laboratorio. Al Sr. José Aviles, por el trabajo fotográfico; a Enrique Vázquez, por el trabajo gráfico; a María Petra Muñoz García, por su asistencia bibliográfica, a Blanca Huerta, por su paciencia en todos nuestros trámites académicos, a Amada, Isabel y Dulce, por la asistencia secretarial. A Juana González Ramírez, siempre preocupada de mi salud y seguridad.

A mis compañeros de laboratorio; en especial a José (pepe), por haberme aguantado durante casi siete años con mucha paciencia y alegría, por haber compartido sus ideas y conocimientos, y ayudarme en mi trabajo. A Paty, por sus consejos de sobrevivencia. A Laura y Efraín, por acompañarme en mis actividades artísticas. A mis alumnos, Martín, Yoshiaki y Janice (culpables de las canas que tengo), por su paciencia. A Mariana, Laura Márquez, Prima, Adriana, Mayra, Rimma, Carlos, Pedro, Pavel, Ulises, Adrian, Alejandro, Ricardo. A mis paisanos y sus familias (Nancy y Julio César). A los compañeros de otros laboratorios e institutos.

A todos mis amigos en México: a Andrés, por su amistad y apoyo en todo momento, gracias!. A Ivonne y a Mariana, por dejarme entrar en sus familias (gracias, Sra. Gloria y Sra. Marta). A Annia, Carol, Gustavo A. (mi hermanito mexicano), Gustavo G., Gustavo V., Martha, mis compañeras de morada, Kristina y Valeria. A Lucy y a todo el grupo de Crisa (Alicia, Amparito, Juanita, Marítima, Yolanda, etc.). A la Sra. Anita y al Sr. Gustavo Rodríguez, por su apoyo y confianza. A Salvador, por ayudarme a aliviar mis males.

A la Sra. Hilda, gracias por ese gran cariño que me ha expresado siempre, y por tratarme como a una hija.

A mis padres y mis hermanos. A todos mis familiares y amigos en Venezuela que año con año durante mi estancia aquí, se han preocupado por mí, me han apoyado y están siempre al pendiente. A todos mis tíos, primos, abuelas (Irene y Manuela). A la Sra. Nora (y a toda la familia Albormoz), a la Sra. Ciria, a la familia Janus (Sra. Gilda, Sr. Pavel, Pavel, Carolina, Daniel, Cristina, Teléfora), a la familia Carreño. A mis amigas: Ana, Betty, Elsa, Jimena, Nacary, Profesora Luisa, Sandra, Solmery. A los profesores de la Universidad de Los Andes que me han apoyado siempre. A las profesoras Beatriz, Carmona, Evelia y Reina.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| α | anti |
| aa | aminoácido(s) |
| AgB | Antígeno B |
| Ac | anticuerpo(s) |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| GLUTs | Facilitadores de glucosa humanos (ej. GLUT1) |
| GTPs | Proteínas transportadoras de glucosa |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| IFN-gamma | Interferón-gamma |
| Ig | Inmunoglobulina |
| Il | Interleucina (ej. Il-4) |
| IPTG | Isopropiltio- β -D-galactósido |
| LB | Medio Luria-Bertani |
| M | Región transmembranal (ej. M6-M7) |
| MSF | superfamilia de los facilitadores (The Mayor Facilitator Superfamily) |
| PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Solución salina amortiguadora de fosfatos |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEG | Polietilenglicol con sales de sodio |
| PEP | Fosfoenol piruvato |
| pfl | Placas formadoras de lisis |
| PM | Peso(s) molecular(es) |
| PMSF | Fenilmetil-sulfonil fluoruro |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SGTPs | Transportadores de glucosa de <i>Schistosoma</i> (ej. SGTP1) |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SP | familia de las facilitadores de azúcares |
| SSC | Solución salina con citratos |
| TAE | Amortiguador de Tris-Acetatos |
| TBE | Amortiguador de Tris-Boratos |
| TGTPs | Transportadores de glucosa de <i>Taenia</i> |
| TLCK | alfa-p-tosil-L-lisin clorometil cetona |
| TNF-alpha | Factor de necrosis tumoral-alfa |
| U.V. | Ultravioleta |
| X-gal | 5-Bromo-4-Cloro-3-idolil- β -D-galactósido |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| II. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. BIOLOGÍA DEL PARÁSITO | 4 |
| 2. MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO | 6 |
| 3. RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO EN LA INTERFASE | 14 |
| 4. ANTECEDENTES | 18 |
| III. HIPÓTESIS | 23 |
| IV. OBJETIVO | 23 |
| METAS ESPECÍFICAS | 23 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 1. MATERIALES BIOLÓGICOS | 24 |
| A. Parásitos | 24 |
| B. Anticuerpos y sueros | 24 |
| C. Células eucariotes y bacterias | 25 |
| D. Bibliotecas de cDNA | 25 |
| 2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR | |
| A. Titulación de las bibliotecas | 25 |
| B. Búsqueda de clonas en las bibliotecas de cDNA del cisticerco de <i>T. solium</i> | |
| i) Obtención de sondas | 26 |
| ii) Marcaje radiactivo de las sondas | 26 |
| iii) Tamizaje de las bibliotecas de cDNA en λ gt10 y λ ZapII | 27 |
| C. Amplificación del DNA por PCR | 27 |
| D. Transformación bacteriana | 27 |
| E. Purificación del DNA plasmídico a partir de las bacterias transformadas | 28 |
| F. Subclonación en el vector M13 | 28 |
| G. Secuenciación del DNA | 29 |
| H. Análisis de las secuencias | 29 |

| | | |
|--|--|----|
| I. | Elaboración de las construcciones de expresión en <i>Xenopus</i> | 30 |
| J. | Elaboración de las construcciones para la expresión de las TGTPs en las células Sf9..... | 30 |
| | i) Subclonación en el vector pVL1393 y co-transfección con baculovirus en células Sf9 | 30 |
| | ii) Cultivo de células de insecto Sf9 | 31 |
| K. | Elaboración de las construcciones de las TGTPs en pRSET y pcDNA3..... | 31 |
| 3. MÉTODOS BIOQUÍMICOS E INMUNOQUÍMICOS | | |
| A. | Obtención de la fracción de membrana de células de insecto y tejido parasitario | 32 |
| B. | Cuantificación de proteínas | 32 |
| C. | Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio | 32 |
| D. | Electrotransferencia de proteínas | 33 |
| | i) Reconocimiento de proteínas por los Ac α -TGTPs | 33 |
| | ii) Reconocimiento de las proteínas con sueros de pacientes neurocisticercosos suero de ratones infectados con <i>T. crassiceps</i> y sueros controles..... | 33 |
| | iii) Reconocimiento de las proteínas sobre el tejido parasitario | 33 |
| E. | Expresión funcional de las TGTPs en ovocitos de <i>Xenopus</i> | 34 |
| F. | Expresión de proteínas recombinantes en bacterias..... | 35 |
| 4. | CITOQUÍMICA..... | 35 |
| VI. RESULTADOS | | |
| | Aislamiento y caracterización molecular de clonas de cDNA que codifican para transportadores de glucosa en <i>T. solium</i> (TGTPs)..... | 37 |
| | Uso de codones | 48 |
| | Expresión funcional de las TGTPs en ovocitos de <i>Xenopus</i> | 53 |
| | Inmunolocalización de las TGTPs en tejidos parasitarios | 56 |
| | Respuesta inmune contra las TGTPs | 62 |
| | Construcciones plasmídicas para la expresión de las TGTPs en bacterias y para ensayos de inmunización | 62 |
| VII. | DISCUSIÓN | 66 |

| | |
|---|-----------|
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 73 |
| IX. ANEXOS | |
| Anexo 1. Secuencias de los transportadores usadas en el trabajo..... | 89 |
| Anexo 2. Alineación de las secuencias de aminoácidos empleada en los análisis de inferencia filogenética..... | 90 |
| Anexo 3. Mapa de los vectores usados en este estudio: pSP64T, pVL1393, pRSET, pcDNA3 | 91 |
| Anexo 4. Artículo publicado "Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm <i>Taenia solium</i> . D. Rodríguez- Contreras, P.J. Skelly, A. Landa, C.B. Shoemaker and J.P. Laclette. <i>Parasitology</i> 117: 579-588, 1998. | |

I. RESUMEN

Los céstodos absorben y consumen grandes cantidades de carbohidratos a través de su superficie tegumentaria. Hay diversos estudios sobre el transporte y metabolismo de la glucosa en estos organismos; sin embargo, no se han identificado las proteínas que median su captación y distribución en los tejidos. En el presente trabajo se describe el aislamiento y caracterización de clonas de cDNA que codifican para proteínas con características de transportadores facilitadores de glucosa (TGTP1 y TGTP2) en el cisticerco de *Taenia solium*, el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. Ensayos de expresión funcional en el sistema de ovocitos de *Xenopus* mostraron que TGTP1 es capaz de transportar 2-desoxiglucosa. Su transporte fue inhibido completamente por D-glucosa y D-manosa, pero no por L-glucosa. Además, el transporte mediado por TGTP1 resultó sensible a inhibidores del transporte facilitado tales como la floretina y la citocalasina B, e insensible a la ouabaina, la cual bloquea los movimientos de sodio de la ATPasa/Na⁺, inhibiendo en transporte activo de glucosa dependiente de sodio. Ensayos de inmunofluorescencia sobre cortes de tejido usando anticuerpos específicos contra cada una de las TGTPs muestran que TGTP1 es abundante en una serie de estructuras relacionadas al tegumento, tanto en la larva como en el parásito adulto de *T. solium*, mientras TGTP2 está localizada sobre la superficie tegumentaria de la larva. Los pacientes con neurocisticercosis no generan una respuesta inmune humoral contra estas proteínas por ensayos de Western blot usando productos recombinantes expresados en baculovirus. Al final se hacen algunas consideraciones acerca de la función de TGTP2.

SUMMARY

Tapeworms absorb and consume large quantities of carbohydrates through their syncytial tegument. Some studies on the metabolism of glucose in several tapeworms are available, however, the proteins that mediate its uptake and distribution in their different tissues have not been identified. In this thesis, we describe the isolation and characterization of cDNA clones encoding two facilitated diffusion glucose transporters (TGTP1 and TGTP2) from the larvae of *Taenia solium*, the causal agent of human and porcine cysticercosis. Functional assays carried out in *Xenopus* oocytes showed that TGTP1 mediates the uptake of 2-deoxyglucose, which is inhibited by the natural stereoisomers D-glucose and D-mannose but not by L-glucose. TGTP1 mediated transport was sensitive to classical inhibitors for facilitated diffusion such as phloretin and cytochalasin B, and insensitive to ouabain, which disrupts active glucose transport by inhibiting the sodium/ATPase pump. Localization studies using specific anti-TGTP1 and anti-TGTP2 antibodies show that TGTP1 is abundant in a number of structures underlying the tegument in adult parasites and larvae, whereas TGTP2 appears be localized only on the tegumentary surface of the larvae and is not detected in adults. Patients with neurocysticercosis do not develop a humoral immune response evaluated by Western blot assays using recombinant TGTPs expressed in baculovirus. At the end of this document, some considerations about TGTP2 function are advanced.

II. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una parasitosis causada por la forma larvaria o cisticerco del céstodo *Taenia solium*, que afecta principalmente al cerdo y al hombre. Esta enfermedad es prevalente en varios países de América Latina, Asia y África. Aunque las tasas reales de prevalencia e incidencia de la enfermedad no se conocen con exactitud, existen numerosos reportes en la literatura que dan idea de la magnitud del problema en diversas regiones (Mahajan, 1982; Mahajan *et al.*, 1982; Schenone *et al.* 1982; Sarti, 1989; Moore *et al.*, 1995; Craig *et al.*, 1996; García-Noval *et al.*, 1996; Legaspi, 1998). La localización del parásito en el sistema nervioso central (SNC) se conoce como neurocisticercosis y es la forma más grave de esta enfermedad en el humano, siendo en México la principal causa de consulta neurológica por epilepsia y la causa del 25% de los tumores intracraneales (Velasco-Suarez *et al.*, 1982; Del Brutto y Sotelo, 1988; Rolfs *et al.*, 1995). Esta enfermedad puede permanecer latente por muchos años sin producir sintomatología. Sin embargo, las personas afectadas pueden desarrollar un amplio espectro de manifestaciones clínicas como cefaleas, convulsiones, hidrocefaleas o algunos otros desórdenes del SNC que pueden llevar a la muerte. En México se estima que la neurocisticercosis es la causa del 1% de todas las muertes en los hospitales generales, teniendo una prevalencia post-mortem superior al 3% (Rabiela *et al.*, 1979; Velasco-Suarez *et al.*, 1982). Además, la economía se ve afectada no solo por la disminución en la actividad productiva de los pacientes y por los elevados gastos de hospitalización, diagnóstico y tratamiento, sino también por las pérdidas económicas en la industria de alimentos elaborados con carne de cerdo (Flisser *et al.*, 1991; Tsang y Wilson, 1995). En México, los costos por tratamiento para neurocisticercosis alcanzaron los 82 millones de dólares durante 1992 (Roberts *et al.*, 1994). Esto sin considerar que el 75% de las personas infectadas se encuentran en edad productiva, quedando muchos de ellos incapacitados para trabajar (Flisser, 1988). Con respecto a la porcicultura se ha mencionado que las pérdidas económicas debidas a decomiso de carne infectada han alcanzado un promedio anual del 65% de la inversión, lo que representó una pérdida de 43 millones de dólares en 1980 (Acevedo-Hernández, 1982). Por todo esto, la infección por *T. solium* es considerada un serio problema de salud pública tanto en México como en muchos países en desarrollo, además de las consideraciones socio-económicas que implica.

1. BIOLOGÍA DEL PARÁSITO

Taenia solium pertenece al phylum Platyhelminthes (del griego *Plati*, plano; *Helmins*, gusano), que incluye parásitos metazoarios altamente especializados (Willms, 1998). El parásito adulto habita en el tracto digestivo del ser humano, mientras el estadio larvario se aloja en diversos órganos y tejidos de sus huéspedes intermediarios (cerdo, perro, mono, jabalí, etc.) (Aluja *et al.*, 1987). Taxonómicamente, *T. solium* se clasifica de la siguiente manera:

| | |
|----------|------------------|
| Reino | Animalia |
| Subreino | Metazoa |
| Phylum | Platyhelminthes |
| Clase | Cestoda |
| Subclase | Eucestoda |
| Orden | Cyclophyllidea |
| Familia | Taeniidae |
| Género | <i>Taenia</i> |
| Especie | <i>T. solium</i> |

CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*.

Taenia solium es un parásito heteroxeno cuyo ciclo de vida involucra dos tipos de huéspedes: un huésped intermediario (el cerdo, principalmente) que alberga la forma larvaria o cisticerco y un huésped definitivo, el hombre, que alberga al 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. Además, como el hombre es el único huésped definitivo de *T. solium*, la prevalencia de la cisticercosis depende exclusivamente de la relación que el hombre establece con el cerdo, observándose las más altas prevalencias en regiones donde la población vive en condiciones insalubres, con fecalismo al aire libre y donde los cerdos son criados libremente y sacrificados sin inspección veterinaria (Aluja *et al.*, 1987; Sarti, 1997).

La cisticercosis es adquirida por el huésped intermediario al ingerir los huevos de *T. solium* presentes en heces y alimentos contaminados (Fig. 1). En el tubo digestivo del huésped la acción de las enzimas proteolíticas y de las sales biliares destruyen las envolturas protectoras

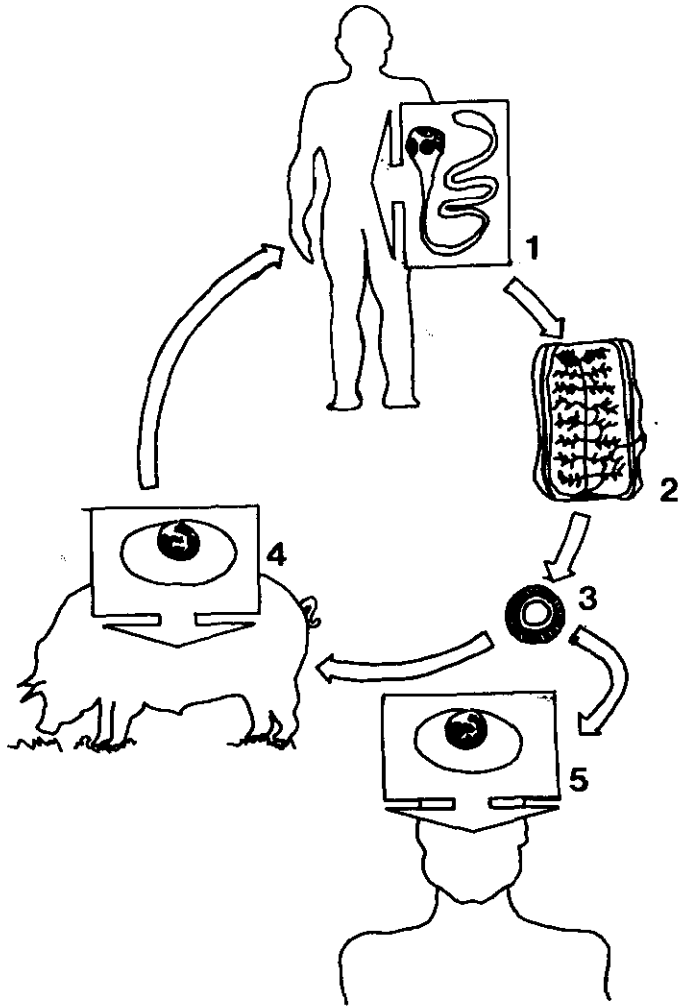


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. 1. Parásito adulto (huésped definitivo); 2. Proglótido grávido; 3. Huevo (medio ambiente); 4. Cisticerco (huésped intermediario); 5. Cisticerco (huésped intermediario accidental).

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 variedad de órganos y tejidos (músculo esquelético, miocardio, sistema nervioso, ojos, tejido subcutáneo, entre otros) donde se desarrolla hasta convertirse en cisticerco. Se requieren por lo menos 10-12 semanas para que el embrión se convierta en la larva (Aluja *et al.*, 1987).

El ciclo se completa cuando el ser 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 (Morales y Cañedo, 1982). Una vez evaginado, el escólex se fija por sus ventosas y ganchos a la mucosa intestinal (Merchant *et al.*, 1998), donde crece y se diferencia en un parásito adulto, el cual llega a medir de 1.5-8 metros de largo. A los 3-4 meses de la infección, ya se observan proglótidos grávidos conteniendo aproximadamente 60 mil huevos cada uno (Willms, 1998). Los proglótidos grávidos se desprenden y salen al exterior con las heces. Éstos se desintegran en el medio ambiente liberando los huevos embrionados, que pueden resistir condiciones desfavorables por períodos prolongados, y que son capaces de infectar al huésped intermediario produciéndole la cisticercosis, completándose así el ciclo (Flisser *et al.*, 1997).

2. MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO

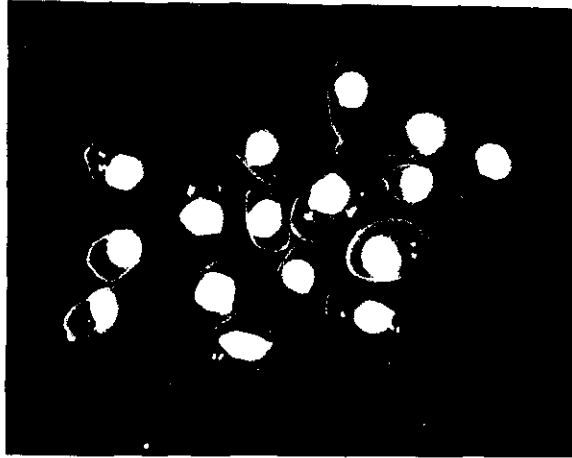
En general, los céstodos se caracterizan por ser gusanos planos, multisegmentados, hermafroditas y por carecer de tubo digestivo. Son organismos acelomados con simetría bilateral y órganos ya formados por tejidos y organizados en sistemas. Además, *T. solium* presenta un órgano fijador denominado escólex con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos (Smyth, 1994).

Estadio larvario.

El cisticerco de *T. solium* es una vesícula translúcida redonda u ovoide de 0.5 a 2 cm de diámetro, con un escólex invaginado y opaco, semejante al de la etapa adulta (Fig. 2). La vesícula está llena de un fluido transparente llamado fluido vesicular, que contiene proteínas del parásito y del huésped (Willms *et al.*, 1982; Ambrosio *et al.*, 1994).

La superficie de la pared vesicular está formada por el tegumento que es un citoplasma sincicial, anucleado y continuo cuya membrana externa se encuentra aumentada por proyecciones digitiformes llamadas microtricas recubiertas por un abundante glicocáliz (Fig. 3). Este glicocáliz está formado por glicoproteínas y glicolípidos, los cuales poseen principalmente carbohidratos D-manósidos y/o D-glucósidos expuestos, siendo su distribución relativamente homogénea sobre la superficie (Lumsden, 1972; Trimble y Lumsden, 1975; Willms *et al.*, 1980; Mills *et al.*, 1984; Sandeman y Williams, 1984; Lamsam y McManus, 1990). El citoplasma del tegumento contiene mitocondrias y numerosas vesículas. La membrana plasmática 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 Golgi, ribosomas y abundantes mitocondrias (Ramírez-Bon *et al.*, 1982). 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 externa (Trimble y Lumsden, 1975). Por debajo de la membrana basal se observan varias capas de tejido muscular liso y abundantes depósitos de glucógeno y grasa. A mayor distancia de la superficie se encuentra el sistema protonefridial, constituido por una red de conductos que terminan en las células en flama. Las células en flama tienen forma de copa, con un núcleo ovoide basal y una porción apical formada por un conjunto de cilios, cada uno constituido a su vez por microtúbulos con una organización hexagonal común de 9+2 (Ramírez-Bon *et al.*, 1982; Cárdenas-Ramírez *et al.*, 1982). El sistema nervioso es poco desarrollado y está formado por una red profusa de fibrillas en el área rostelar del escólex y un agrupamiento denso de células nerviosas multipolares en un estroma fibrilar que rodea a esta área. También contiene grupos abundantes de fibras nerviosas distribuidas entre los fascículos musculares, y células de tipo nervioso que se localizan muy

A



B

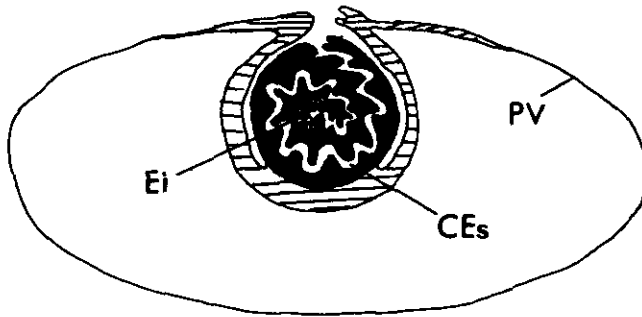


Figura 2. El cisticerco de *Taenia solium*. **A.** cisticercos con pared vesicular intacta disecados de músculo esquelético de cerdo. **B.** Representación esquemática del cisticerco (tomado de Slais, 1970). CEs, canal espiral; Ei, escólex invaginado; PV, pared vesicular.

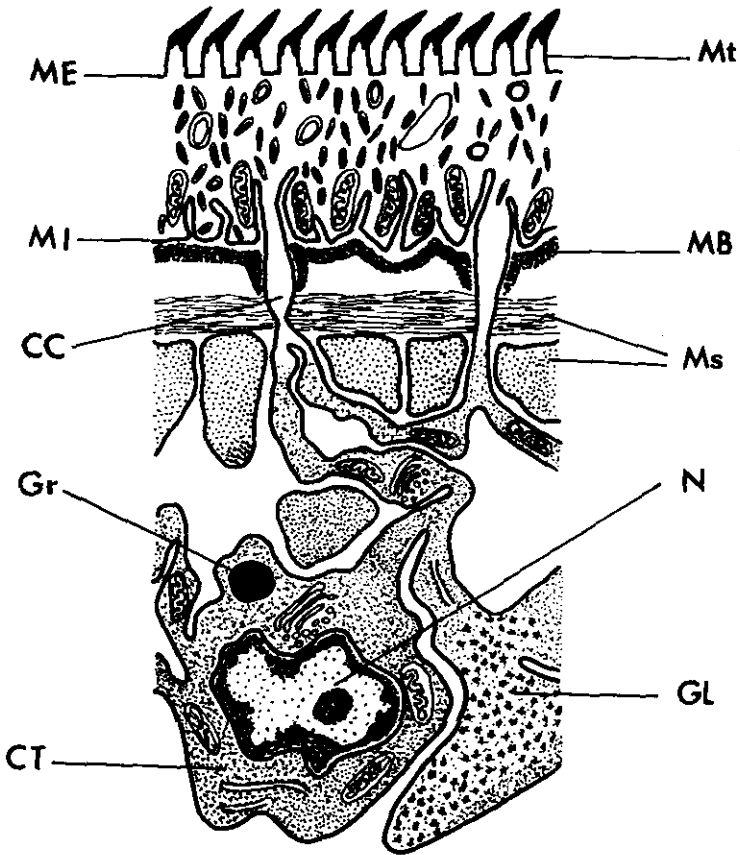


Figura 3. Representación esquemática de la pared vesicular de los céstodos (tomado de Smyth, 1969). CC, canales citoplasmáticos; CT, citones tegumentarios; GL, glucógeno; Gr, depósitos de grasa; MB, membrana basal; ME, membrana plasmática externa; MI, membrana plasmática interna; Ms, tejido muscular; Mt, microtrícas; N, núcleo.

cerca del área del rostelo en el escólex. Estas células aparentemente contienen vesículas neurosecretoras, algunas de las cuales originan una reacción de colinesterasa, la cual sugiere que constituyen ordenamientos sinápticos (Cárdenas-Ramírez *et al.*, 1982; Flisser *et al.*, 1997).

Estadio adulto.

El parásito adulto tiene apariencia de cinta o listón y mide de 1.5 a 8 metros de largo. Su cuerpo está formado por el escólex (Fig. 4), el cual le permite fijarse a la mucosa intestinal del huésped a través de sus ventosas y ganchos (Merchant *et al.*, 1998). La corona interna posee 11 a 14 ganchos largos (de 0.13 a 0.16 mm), mientras la corona externa está formada por un número similar de ganchos pequeños (de 0.10 a 12 mm) (Verster, 1969). A continuación del escólex se encuentra una zona de crecimiento con alta actividad mitótica llamada **cuello**, que da origen al **estróbilo**. El estróbilo está formado por una cadena de segmentos denominados **proglótidos**, los cuales se encuentran en distinto grado de diferenciación, dependiendo de la posición que ocupan en el estróbilo. Los más cercanos al cuello son inmaduros, sin órganos sexuales desarrollados. Posteriormente, se observan los proglótidos maduros, que han desarrollado órganos sexuales tanto masculinos como femeninos, lo que caracteriza a estos parásitos como hermafroditas. Los más lejanos al escólex son los proglótidos grávidos, por presentarse llenos de huevos.

El aparato genital masculino está formado por numerosos testículos de forma redondeada, distribuidos en el parénquima del proglótido y conectados por finos canales eferentes que se reúnen para formar el conducto deferente o eyaculador, cuyo final se encuentra modificado para formar un órgano muscular copulatorio llamado cirro (Fig. 4). Este conducto desemboca en el poro genital, en el cual también se abre el atrio vaginal, que es el conducto femenino que recibe a los espermatozoides y los conduce al receptáculo seminal conectado al oviducto donde se lleva a cabo la fertilización en el mismo proglótido. El aparato femenino presenta un ovario constituido por dos lóbulos grandes y uno pequeño, que libera los óvulos hacia el oviducto. Después de la fertilización en el oviducto, los huevos se rodean de células vitelinas que se forman en las glándulas vitelógenas cuando éstos pasan a través de la apertura del conducto vitelino y entran en el ovotipo. El ovotipo es una región bulbosa del conducto vitelino que está rodeada por las

A



B

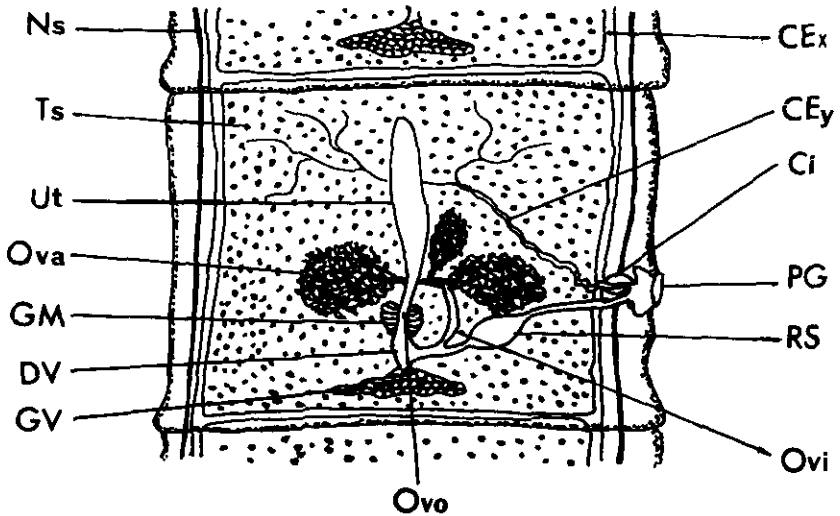


Figura 4. El parásito adulto de *Taenia solium*. **A.** El escólex de *T. solium* observado en el microscopio electrónico de barrido. **B.** Representación esquemática del aparato reproductor y morfología del proglótido maduro. Ci, cirro; C, cuello; CEx, canal excretorio; CEy, conducto eyaculador; DV, ducto vitelógeno; GM, glándulas de Mehlis; GV, glándulas vitelógenas; Ns, tronco nervioso; Ova, ovario; Ovi, oviducto; Ovo, ovotipo; PG, poro genital; RS, receptáculo seminal; R, rostelo; Ts, testículos; Ut, útero; V, ventosa.

glándulas de Mehlis y las glándulas vitelógenas, las que proporcionan secreciones mucosas y serosas que probablemente sirven de substrato al embrióforo. Finalmente, los huevos se acumulan en el útero, constituido por una formación tubular rectilínea que presenta de 7 a 15 ramas laterales (Aluja *et al.*, 1987).

Los huevos son el único estadio de desarrollo en el ciclo de vida de este parásito que se encuentra en el medio externo. En *T. solium*, los huevos maduran en el útero, observándose en su interior la oncosfera o embrión hexacanto, llamado así por presentar 6 ganchos (Fig. 5). La oncosfera se encuentra en un estado inactivo o de "reposo", el cual es modificado cuando las condiciones son favorables para la continuación del ciclo de vida del parásito, generalmente en el intestino de su huésped intermediario. Los huevos son esféricos, miden de 31 a 56 micras de diámetro y tienen apariencia radial cuando se observan bajo el microscopio de luz (Flisser *et al.*, 1997). En el interior del embrión se han observado ganchos, fibras musculares y algunas células en flama (Smyth, 1994). Varias envolturas se encuentran rodeando al embrión, cada una con características particulares (Laclette *et al.*, 1982). El vitelo delimitado por su cápsula constituye la envoltura más externa del huevo de *T. solium*. Esta capa delgada y lábil se presenta como una envoltura celular sincicial caracterizada por la presencia de elementos citoplásmicos tales como mitocondrias, glucógeno o incluso, núcleos celulares en los huevos más jóvenes. Esta envoltura de vitelo no se encuentra presente en los huevos encontrados en la material fecal, y se sugiere que se encarga de la protección y nutrición de la oncósfera antes de que el embrióforo esté bien formado. Por debajo de la envoltura vitelar se encuentra la **membrana embriofórica externa**, la cual se presenta como una membrana flexible y discontinua con apariencia de cráter, muy relacionada con la superficie externa del embrióforo. El **embrióforo** es la cubierta más importante del huevo. Protege al embrión mientras el huevo está en el ambiente exterior y está formado por bloques electro-densos de proteínas parecidas a queratina, unidos por una sustancia cementante. Estos bloques proteicos son resistentes a los jugos digestivos, no así la sustancia cementante, permitiendo la separación de los bloques al pasar por el tubo digestivo del huésped, liberándose así la oncósfera. La **célula embriofórica**, la cual se extiende por debajo de la superficie interna del embrióforo, es de origen sincicial y tiene una apariencia granular debido a la

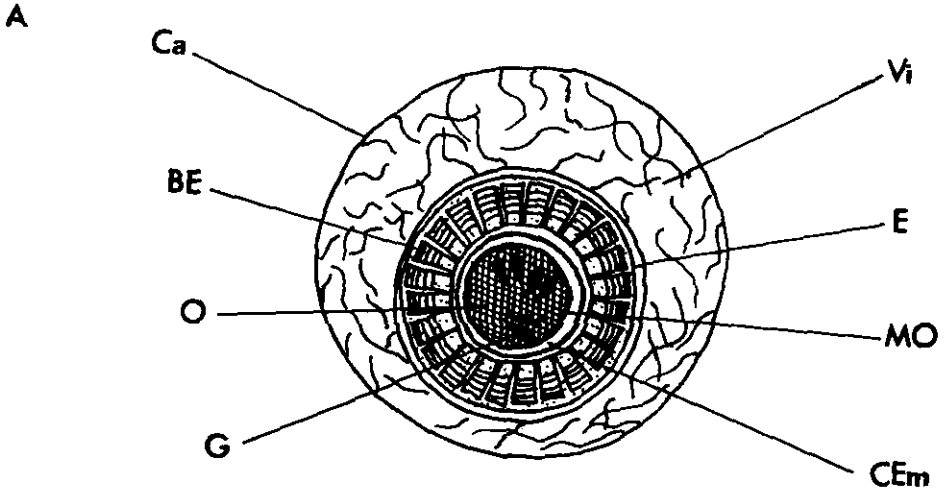


Figura 5. El huevo de *Taenia solium*. A. Ilustración esquemática de la morfología del huevo (tomado de Slais, 1970). B. Corte de un huevo observado en el microscopio electrónico de barrido. BE, bloques embriofóricos; Ca, cápsula; CEm, célula embriofórica; E, embrióforo; G, ganchos; MO, membrana oncosferal; O, oncosfera; Vi, vitelo.

presencia de abundantes elementos parecidos a ribosomas. Se considera que la función de esta envoltura es la de sintetizar al embrióforo. La envoltura más interna es la **membrana oncosferral**, la cual es impermeable a las condiciones ambientales externas, pero se vuelve permeable cuando se pone en contacto con el jugo gástrico, permitiendo la activación del embrión expuesto (Laclette *et al.*, 1982).

3. 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, resistiendo la acción de enzimas proteolíticas y la respuesta inmune del huésped, sino que actúa como 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 glicocálix muestra una serie de propiedades que permiten asociarlo con diversas actividades. Contiene sitios de unión catiónicos y aniónicos que proveen sitios de unión para varios electrolitos (Pappas, 1983). La habilidad del glicocálix 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 glicocálix, tal vez para evadir el ataque enzimático e inmunológico del huésped (Oaks y Lumsden, 1971; Trimble y Lumsden, 1975). Algunos componentes del glicocálix, 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; Pappas, 1975; Arme, 1988; 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 (Grogl *et al.*, 1985; Tsang *et al.*, 1989; Feldman *et al.*, 1990).

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 y Vargas, 1988; Escobar-Izquierdo, 1989). 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 y Vargas, 1988). Cabe hacer notar que los primeros grados de reacción son los que se observan alrededor de cisticercos viables. Con algunas diferencias, algo similar ha sido observado en el parénquima cerebral de pacientes con neurocisticercosis (Escobar-Izquierdo, 1989). 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 y Vargas (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 larva, 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 observa 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 en el sistema nervioso. Los cisticercos localizados en el parénquima cerebral sobreviven muchos años sin desencadenar una respuesta inflamatoria considerable (Rabiela *et al.*, 1982; Escobar-Izquierdo, 1989).

Uno de los hechos más relevantes en la biología de la relación huésped-ténidos, es la existencia de una inmunidad adquirida en el huésped intermediario. Se produce una fuerte inmunidad contra la oncosfera y el estado post-oncosférico temprano de muchos ténidos (Craig *et al.*, 1996). La presencia de una respuesta inmune concomitante ha sido demostrada en varios modelos experimentales de cisticercosis. Por ejemplo, la infección de ratas con metacístodos de *T. taeniaeformis* induce una resistencia pronunciada a la reinfección (Rickard y Williams, 1982). En el caso de la cisticercosis porcina, cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium* desarrollan resistencia a la reinfección al menos por cinco meses (Aluja *et al.*, 1999). Aparentemente, el huésped infectado es capaz de rechazar una nueva infección, pero incapaz de destruir a los cisticercos ya establecidos. En infecciones naturales, 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). No se conoce el mecanismo de la supresión de la respuesta inmune, sin embargo, se han descrito diferentes factores que podrían estar participando en la misma. En la larva 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).

Asimismo, se ha descrito en el cisticerco de *T. solium* un dímero péptido-RNA capaz de inhibir *in vitro* la respuesta humoral y celular a antígenos parasitarios, así como la producción de diversas citocinas como IL-2, IL-4, IFN-gamma y TNF-alpha (Arechavaleta *et al.*, 1998). Además, este factor es capaz de inhibir la inflamación que rodea a parásitos implantados subcutáneamente en ratones. Se ha propuesto que la feminización de ratones machos inducida por los cisticercos de *T. crassiceps* haciéndolos más susceptibles a la infección podría estar involucrada en este fenómeno (Larralde *et al.*, 1995).

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 "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. Asimismo, se ha descrito la producción y/o secreción de proteínas con capacidad de degradar moléculas citotóxicas y de inhibir la cascada del complemento, como es el caso de la taeniaestatina, una proteína de *T. taeniaeformis* que puede inhibir el factor D de la vía alternativa del complemento (Leid y Suquet, 1986; Leid *et al.*, 1986; Hammerberg *et al.*, 1980; 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). Otro hecho notable en la evasión de la respuesta inmune por estos parásitos es la presencia de inmunoglobulinas y componentes del complemento en la superficie de diversas larvas sin que les causen daño aparente (Willms y Arcos, 1977; Threadgold y Befus, 1977; Sogandares-Bernal y Voges, 1978; Siebert *et al.*, 1981; Correa *et al.*, 1985; Leid, 1988). Estas inmunoglobulinas son internalizadas por el parásito a través de endocitosis, representando tal vez una función protectora generada por remoción inespecífica de todas las inmunoglobulinas de la interfase huésped-parásito (Hustead y Williams, 1977; Ambrosio *et al.*, 1994).

En la compleja relación que se establece entre el cisticerco y su huésped también participa la activación diferencial de la respuesta inmune tipo Th1 y Th2. Las células T están involucradas en la respuesta inmune protectora contra la cisticercosis murina por *T. crassiceps*, observándose que ratones infectados crónicamente presentan inmunosupresión localizada de células T, afectándose los eventos tardíos en la vía de señalización TCR-CD3, y presentándose altos niveles de IL-4 (asociada con la respuesta Th2) y bajos niveles de IL-2 (Bojalil *et al.*, 1993; Villa y Kuhn, 1996). Asimismo, el crecimiento de la infección parasitaria está relacionada con cambios en el tipo de respuesta inmune que se genera en el transcurso de la infección, caracterizada inicialmente por una baja tasa de reproducción del parásito acompañada por una respuesta tipo Th1, la cual es substituida por una fuerte respuesta tipo Th2 como la infección progresa en el huésped (Terrazas *et al.*, 1998). Estos hallazgos sugieren que la modulación de la respuesta inmune en los cisticercos facilitan la sobrevivencia del parásito.

4. ANTECEDENTES

Una variedad de procesos bioquímicos ocurren en la interfase huésped-parásito de los céstodos, incluyendo absorción, secreción, digestión y protección. Cada uno de estos procesos juega un papel importante en la manutención del estilo de vida parasitario, lo que ha permitido a los céstodos mantenerse y competir con su huésped por los recursos disponibles (Pappas, 1983). La absorción es la función asociada a la interfase huésped-parásito más estudiada en los céstodos. La utilización de los nutrientes en los parásitos al igual que en otros seres vivos, está directamente relacionada con el ambiente en el cual se desarrollan. Asimismo, se ha observado la adaptación de los sistemas específicos de captación de solutos dependiendo de las características del medio ambiente (Waïmsley *et al.*, 1998). Los céstodos poseen diferentes mecanismos de transporte de solutos orgánicos: difusión simple, difusión facilitada y transporte activo (Pappas y Read, 1975).

Los céstodos absorben y consumen grandes cantidades de carbohidratos guardando el exceso como glucógeno, el cual es degradado y utilizado en condiciones de carencia de carbohidratos (Roberts, 1983). En todos los estadios parasitarios se observan cantidades

relativamente grandes de polisacáridos, principalmente en forma de glucógeno (Read y Simmons, 1963). Los céstodos adultos tienen requerimientos sustanciales de carbohidratos para llevar a cabo en forma óptima su desarrollo y reproducción (von Brand *et al.*, 1964; Smyth, 1969). Las larvas aceleran su crecimiento y maduración en altas concentraciones de glucosa (Graham y Berntzen, 1970). La glucosa es el principal monosacárido utilizado por estos parásitos para obtener energía y es el único monosacárido glicogénico en algunas especies de céstodos (Pappas y Read, 1975). Es por esto que la mayoría de los reportes caracterizando el transporte de monosacáridos en céstodos han estudiado el transporte de glucosa. Su transporte, en diversas especies de céstodos, se lleva a cabo por sistemas saturables, sensible a cambios de pH e inhibidos por monosacáridos estructuralmente relacionados y diversos agentes químicos (Pappas y Read, 1975). Todas estas propiedades indican que el transporte de glucosa en la membrana tegumental es mediado por sistemas de acarreadores específicos. La absorción de carbohidratos en los parásitos adultos de *Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *T. taeniaeformis* y *Calliobothrium verticulatum*, se lleva a cabo contra un gradiente de concentración, es dependiente de sodio e inhibido por ouabaina, similar a lo que ocurre en las células intestinales de los mamíferos (Phiffer, 1961; Fisher y Read, 1971). Este tipo de transporte activo de nutrientes es muy favorable en el ambiente donde se desarrollan los gusanos adultos dado que las concentraciones de carbohidratos en el intestino son muy variables, llegando incluso a ser muy bajas. En contraste, las larvas viven en un ambiente donde las concentraciones de glucosa son altas y se mantienen relativamente constantes, por lo que sería de esperarse que una parte considerable del movimiento de azúcares sea llevado a cabo principalmente por difusión facilitada. En las larvas de *T. crassiceps*, *T. taeniaeformis* y *H. diminuta* el transporte de glucosa es parcialmente sensible a sodio e inhibido por florizina, sugiriendo que dos tipos de sistemas de transporte operan en la superficie de la larva, uno de los cuales no es dependiente de sodio (von Brand *et al.*, 1964; Arne *et al.*, 1973; Pappas y Read, 1973). Sin embargo, la larva de *T. taeniaeformis* es incapaz de absorber glucosa contra un gradiente de concentración, es decir, cuando la concentración externa de glucosa es menor que la concentración interna del parásito (von Brand *et al.*, 1964). Además, el transporte de glucosa en *T. crassiceps* es inhibido por la fletina y la floricina, pero no es inhibido por la ouabaina, la cual bloquea los movimientos de

sodio de la ATPasa/Na⁺, inhibiendo el transporte activo de glucosa dependiente de sodio (Pappas y Read, 1973). Dos tipos de transporte de glucosa han sido localizados en diferentes tejidos del cisticercoides infectivo de *H. diminuta*. En la superficie de la pared vesicular se lleva a cabo la absorción de este nutriente principalmente por difusión facilitada, la cual es perdida cuando la larva evagina; mientras, en la membrana plasmática del escólex se desarrolla un tipo de transporte activo dependiente de sodio, similar al de los adultos (Rosen y Uglem, 1988). Este tipo de transporte es observado 75 minutos post-evaginación, y aumenta considerablemente entre las 4-6 horas siguientes (Rosen *et al.*, 1994). Sin embargo, puesto que el escólex invaginado no tiene contacto directo con el medio que rodea a la larva, ésta es dependiente de las propiedades absorbivas de su pared vesicular (Arme, 1988).

En el cisticercos de *T. solium* son escasos los trabajos sobre absorción y metabolismo de glucosa. Las proteínas que median la captación y distribución de glucosa no han sido purificadas ni caracterizadas. Asimismo, se desconoce la importancia de estas proteínas para el parásito y la relación que establece con su huésped.

La facilidad para secuenciar el DNA ha permitido determinar la estructura primaria de los transportadores de azúcares de muchos organismos. Tales estudios han revelado que se trata de una familia de proteínas estructuralmente relacionadas en organismos eucariontes y procariontes, que pertenecen a una superfamilia principal con más de quince distintas familias (The Major Facilitator Superfamily, MFS) (Maiden *et al.*, 1987; Baldwin, 1993; Tetaud *et al.*, 1997; Walmsley *et al.*, 1998; Pao *et al.*, 1998). Esta familia, la cual será referida como la familia de los transportadores de azúcares (SP), incluye los transportadores pasivos de glucosa de los mamíferos, así como transportadores tanto pasivos como activos (simporter azúcar/H⁺) de plantas superiores, algas verdes, protozoarios, levaduras, cianobacterias y eubacterias. Estas proteínas no parecen estar relacionadas con los transportadores manejados por PEP y ATP en bacterias, ni a los transportadores de Glucosa/Na⁺ encontrados en la membrana plasmática apical de las células epiteliales del intestino y del riñón en mamíferos.

Las proteínas que pertenecen a esta familia de transportadores de azúcares son proteínas integrales de membrana con un tamaño molecular promedio de 50-55 kDa. Mueckler y col. (1985), clonaron y secuenciaron el gen que codifica para el transportador de glucosa de eritrocitos humanos, GLUT1. El análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos predicha para GLUT1 reveló que esta proteína era altamente hidrofóbica y sugirieron que aproximadamente el 50% de la proteína se inserta en la bicapa lipídica. Basados en estos análisis y en ensayos de digestión proteolítica vectorial, propusieron un modelo de topología en la membrana para GLUT1, en el cual la proteína está formada por 12 regiones transmembranales quedando las regiones amino y carboxilo terminales de la proteína orientadas hacia el interior de la célula (Fig. 6). Esta orientación en la membrana plasmática ha sido confirmada por estudios usando anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones de la proteína GLUT1, y mutantes para sitios de glicosilación, expresadas en *Xenopus* (Davies *et al.*, 1987; Haspel *et al.*, 1988; Hresko *et al.*, 1994). Además, muchos de los miembros de esta familia tienen una asa hidrofílica grande externamente orientada entre los dos primeros segmentos transmembranales, y otra asa grande orientada citoplásmicamente entre los segmentos M6 y M7. Otra característica de los transportadores de glucosa es la presencia de un sitio único de N-glicosilación en la primera asa externa, involucrado en la función de transporte en células de mamíferos (Asano *et al.*, 1991; Feugeas *et al.*, 1991).

Hasta el momento, se han descrito cinco miembros de la familia SP en mamíferos (Mueckler, 1994). Estas proteínas están expresadas de una manera específica en células y tejidos, y exhiben distintas cinéticas y propiedades reguladoras que reflejan su papel funcional específico (Baldwin, 1993). En parásitos, se han realizado grandes avances en la caracterización molecular de estas proteínas en protozoarios del género *Leishmania* y *Trypanosoma* (Langford *et al.*, 1994; Tetaud *et al.*, 1997), así como en el platelminto *Schistosoma mansoni* (Skelly *et al.*, 1994). La función de estas proteínas ha sido verificada por expresión en ovocitos de *Xenopus* y células CHO, caracterizándose 7 transportadores de hexosas y un transportador de mio-inositol homólogo en protozoarios, y dos transportadores de hexosa en *Schistosoma*. Algunas de estas proteínas se expresan diferencialmente durante el ciclo de vida de estos parásitos (Cairns *et al.* 1989; Bringaud y Baltz, 1992; Bringaud y Baltz, 1993; Skelly y Shoemaker, 1996). La expresión

diferencial de las proteínas así como las diferencias en la afinidad por los sustratos entre los diferentes transportadores han sido relacionadas con las condiciones fisiológicas experimentadas por estos parásitos (Barrett *et al.*, 1998; Skelly *et al.*, 1998).

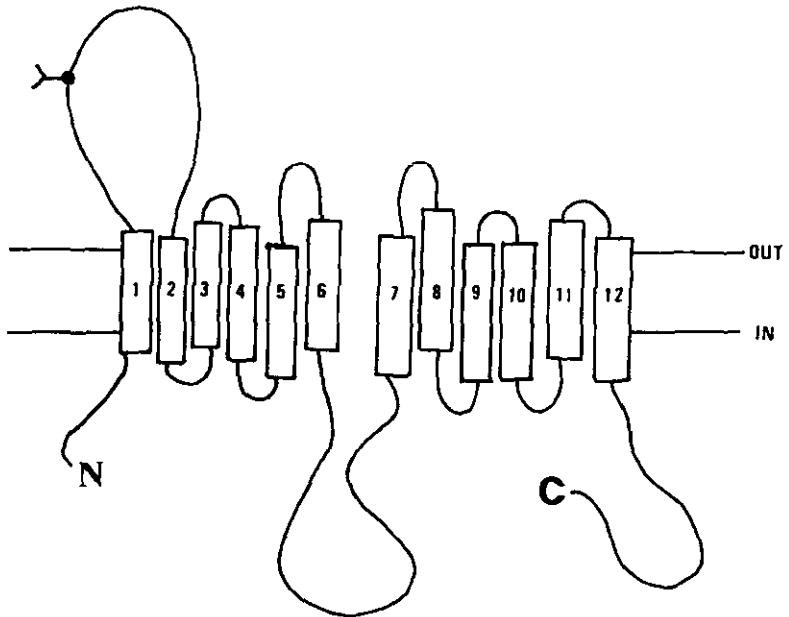


Figura 6. Modelo de orientación en la membrana plasmática de GLUT1. Las 12 regiones transmembranales son mostradas como cajas y están numeradas del 1 al 12. El sitio de N-glicosilación entre las dos primeras regiones transmembranales es mostrado. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales están orientados al interior de la célula (tomado de Gould y Holman, 1993).

III. HIPÓTESIS

Dado que la larva o cisticerco de *T. solium*, se desarrolla en un ambiente donde la concentración de glucosa es alta y se mantiene relativamente constante, es de esperarse que el parásito utilice preferentemente la difusión facilitada como sistema de transporte para internalizar la glucosa del medio externo, y para distribuir el azúcar a través de la pared vesicular del parásito. Por lo tanto, se espera aislar, caracterizar e identificar las moléculas transportadoras involucradas.

IV. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización molecular del sistema de transporte de glucosa mediado por proteínas facilitadoras en el cisticerco de *T. solium*. La caracterización de estas proteínas, así como su localización en los tejidos del parásito permite proponer una hipótesis sobre la función específica de los transportadores encontrados en los distintos compartimentos parasitarios.

METAS ESPECÍFICAS.

1. Clonar y caracterizar molecularmente proteínas con características de transportadores facilitadores de glucosa, a partir de la biblioteca de cDNA de cisticercos de *T. solium*.
2. Expresar las clonas obtenidas en un sistema heterólogo (ovocitos de *Xenopus*) que nos permita caracterizarlas funcionalmente como transportadores de glucosa.
3. Realizar estudios de inmunolocalización de las proteínas sobre el tejido parasitario, a través de la producción de anticuerpos específicos, para proponer su papel en el parásito.
4. Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por las proteínas en pacientes con neurocisticercosis, mediante ensayos de Western blot.

III. HIPÓTESIS

Dado que la larva o cisticerco de *T. solium*, se desarrolla en un ambiente donde la concentración de glucosa es alta y se mantiene relativamente constante, es de esperarse que el parásito utilice preferentemente la difusión facilitada como sistema de transporte para internalizar la glucosa del medio externo, y para distribuir el azúcar a través de la pared vesicular del parásito. Por lo tanto, se espera aislar, caracterizar e identificar las moléculas transportadoras involucradas.

IV. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización molecular del sistema de transporte de glucosa mediado por proteínas facilitadoras en el cisticerco de *T. solium*. La caracterización de estas proteínas, así como su localización en los tejidos del parásito permite proponer una hipótesis sobre la función específica de los transportadores encontrados en los distintos compartimentos parasitarios.

METAS ESPECÍFICAS.

1. Clonar y caracterizar molecularmente proteínas con características de transportadores facilitadores de glucosa, a partir de la biblioteca de cDNA de cisticercos de *T. solium*.
2. Expresar las clonas obtenidas en un sistema heterólogo (ovocitos de *Xenopus*) que nos permita caracterizarlas funcionalmente como transportadores de glucosa.
3. Realizar estudios de inmunolocalización de las proteínas sobre el tejido parasitario, a través de la producción de anticuerpos específicos, para proponer su papel en el parásito.
4. Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por las proteínas en pacientes con neurocisticercosis, mediante ensayos de Western blot.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES BIOLÓGICOS

A. *Parásitos*. Los cisticercos de *T. solium* fueron obtenidos por disección de músculo esquelético de cerdos infectados. Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c mantenidos en el laboratorio. El parásito adulto de *T. saginata* fue gentilmente donado por la Dra. A. Aluja (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM) y el parásito adulto de *T. solium*, fue obtenido de hamster experimentalmente infectado, amablemente proveído por J. Ambrosio y A. Flisser (Facultad de Medicina, UNAM). Todos los tejidos se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.2 (PBS) y rápidamente fueron congelados a -70°C hasta su uso, en algunos casos previa inclusión en Tissue-tek (Miles Inc.).

B. *Anticuerpos y sueros*. Para la producción de anticuerpos (Ac) específicos contra cada una de las TGTPs se sintetizaron los péptidos correspondientes a la región carboxilo terminal de las proteínas TGTP1 (NH₂-CEAATALRRSDEEDAKVDA-COOH) y TGTP2 (NH₂-CRSLPSENGENMTKSDRVKF-COOH). Los péptidos fueron acoplados a albúmina bovina y se usaron para inmunizar conejos como se describe en Zhong *et al.*, (1995). Los Ac dirigidos contra cada una de las TGTPs fueron purificados, a partir del suero de los conejos inmunizados, por cromatografía de afinidad hacia cada péptido acoplado a ovalbúmina conjugados a columnas HiTrap NHS-activadas (Pharmacia Inc.). Los Ac retenidos, denominados Ac α -TGTP1c y α -TGTP2c respectivamente, fueron eluidos en glicina 0.1 M, pH 2.5, neutralizados con Tris pH 8.0 y dializados exhaustivamente en PBS. Los sueros de pacientes cisticercosos (30 sueros) y de pacientes con problemas neurológicos, negativos para cisticercosis (30 sueros), fueron amablemente suministrados por D. Correa (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, México, D.F.). Los sueros de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* fueron obtenidos por sangrado de la cola de animales con 2 meses de infección. Todos los anticuerpos y sueros fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

C. *Células eucariotes y bacterias*. Para la expresión proteica en células de insecto infectadas con baculovirus se usó la línea celular de cultivo Sf9, derivada del insecto *Spodoptera frugiperda* (Eukaryotae; Metazoa; Arthropoda; Tracheata; Insecta; Pterygota; Lepidoptera; Noctuoidea; Noctuidae; *Spodoptera*). Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el presente proyecto fueron:

C600hflA

fenotipo: *supE44 hsdR thi-1 leuB6 lacY1 tonA21 hla150 [chr::Tn10(*tef'*)]*

TG1

fenotipo: *supE hsdD5 thi D(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lac^{f'} lacZDM15]*

XL1-BLUE

fenotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 D(lac-proAB) F'proAB lac^{f'}ZDM15 Tn10 (*tef'*)*

D. *Bibliotecas de cDNA*. En el laboratorio se dispone de bibliotecas de cDNA con insertos de tamaño seleccionado (> 2 kb) del ciclo de vida de *T. solium*, construidas en el bacteriófago λ gt10 como se describe en Landa *et al.*, (1993). La biblioteca de cDNA de parásito adulto de *T. solium*, construida en el fagémido λ ZapII, fue suministrada por el Dr. Landa (Facultad de Medicina, UNAM).

2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

A. *Titulación de las bibliotecas*. Se titularon las bibliotecas de cDNA construidas en los bacteriófagos λ gt10 y λ ZapII (Sambrook *et al.*, 1989). Se hizo una dilución 1:50 de un cultivo nocturno de las cepas C600hfa⁺ y XL1-blue, respectivamente, en medio Luria-Bertrani (LB) con 0.2% de maltosa. Se incubó a 37°C por 2 h y se centrifugó a 4000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado de bacterias fue resuspendido en un décimo del volumen inicial en MgSO₄ al 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 minutos. Posteriormente, las

células fueron sembradas en medio LB sólido formando un tapete con medio LB top-agar (0.75%) y se incubaron toda la noche a 37°C. 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 las bibliotecas de cDNA del cisticerco de T. solium.

i) Obtención de sondas. Una sonda fue obtenida como se describe en Rodríguez-Contreras (1996). Brevemente, para obtener la sonda se sintetizaron los oligonucleótidos degenerados GTP-2CG y GTP-3CG (Tabla I, pag. 37), a partir de regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos de transportadores de glucosa humanos y de *S. mansoni*. Se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando como templado DNA de los fagos de λ gt10 de la biblioteca de cDNA del cisticerco de *T. solium*. 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 usando condiciones de alta astringencia (hibridación a 65°C y lavados con SSC 2X), resultando en el aislamiento de las clonas de TGTP2. Una segunda estrategia para el aislamiento de clonas de esta biblioteca de cDNA fue usar DNA conteniendo la región codificadora amino terminal (1 Kb) del transportador de glucosa de *S. mansoni*, SGTP1 (Skelly *et al.*, 1994). El fragmento de DNA fué marcado radiactivamente y usado en el tamizaje de la biblioteca en condiciones de baja astringencia (hibridación a 50°C y lavados con SSC 6X). Clonas diferentes a TGTP2 fueron seleccionadas mediante ensayos de restricción. Esta estrategia dió como resultado el aislamiento de las clonas de TGTP1. Las sondas de las regiones codificadoras completas de TGTP1 y TGTP2 fueron obtenidas por PCR usando las parejas de oligonucleótidos TGTP1X1-TGTP1X2 y TGTP2XOA-TGTP2XOB, respectivamente (Tabla I, pag. 37).

ii) Marcaje radiactivo de las sondas. Las sondas fueron marcadas radiactivamente con $^{32}\alpha$ P (Amersham International, PLC) por el método de "Random Primer" usando el Random Primer DNA Labeling Kit (U.S.B. Corporation).

iii) Tamizaje de las bibliotecas de cDNA en λ gt10 y λ ZapII. Los tamizajes se realizaron siguiendo la técnica de Benton y Davis (1977). Las bacterias 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 minutos y posteriormente neutralizados con una solución de Tris-HCl al 0.5 M (pH 7.4) y NaCl al 0.5 M. El DNA de los fagos fue fijado a las membranas por exposición a luz U.V.(120 milijoules/cm²). Las sondas fueron usadas en el tamizaje de 80000 fagos en condiciones de alta y/o baja astringencia (ver arriba). Las señales de hibridación fueron detectadas por autografiografía 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 colocandolas en 200 μ l de SM. Se dejó difundir los fagos a 37°C por 2h y se guardaron a 4°C para su posterior análisis.

C. *Amplificación del DNA por PCR*. En general, las reacciones se llevaron a cabo como sigue: se realizaron 25 ciclos a 94°C como temperatura de desnaturalización por 30 segundos; 50°C como temperatura de “annealing” por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, como tiempo de extensión. En algunos casos, la temperatura de “annealing” pudo variar según la temperatura óptima para la pareja de oligonucleótidos usados. Los productos de las reacciones fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE. Los fragmentos amplificados fueron purificados por afinidad a polvo de vidrio.

D. *Transformación bacteriana*. Células bacterianas de las cepas TGI y XL1-blue 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 4000 g por 15 minutos 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 en

alícuotas de 40 μ l. Se electroporó 1-2.5 ml de la mezcla de ligación en 40 μ l de las células bacterianas en el "Electro Cell Manipulator^R600" (BTX, INC.). Las bacterias transformadas fueron crecidas en 1 ml de medio LB por 1 h y sembradas sobre cajas del mismo medio con ampicilina (100 μ g/ml).

E. *Purificación del DNA de plásmido a partir de las bacterias transformadas.* Se inoculó una colonia aislada de cada clona a purificar, en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se dejó crecer a 37°C durante toda la noche con agitación continua. El cultivo fue centrifugado a 16000 g durante 20 segundos y el pellet bacteriano fue sometido a lisis alcalina como se describe en Zhou *et al.* (1990). El DNA fue sometido a precipitación etanólica y resuspendido en agua estéril conteniendo RNAsa a una concentración de 100 μ g/ml. En el caso del vector λ ZapII se hizo la excisión de fagémidos. Este vector tiene la particularidad de que se puede manipular para dar origen al fagémido pBluescript SK', a través de un proceso de excisión que necesita de un fago ayudador y de una cepa bacteriana de *E. coli* no supresora, que impida la replicación del fago ayudador. Las clonas positivas se sometieron al proceso de excisión, usando el sistema del fago ayudador ExAssist y de la cepa bacteriana SOLR (Stratagene, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente a la excisión, el DNA fue purificado como se describió arriba.

F. *Subclonación en el vector M13.* Los fragmentos de DNA respectivos, amplificados por PCR usando los oligos λ gt10 5' y λ gt10 3' (Tabla I, pag. 37), fueron ligados al fago M13mp19 previamente digerido con la enzima SmaI, a 16°C durante toda la noche. Células bacterianas de la cepa TG1 de *E. coli* fueron transformadas por electroporación (ver inciso 2D), y sembradas sobre medio LB sólido en una capa de agar al 0.7%, 1.5 mg de Blue-gal y 0.48 mg de IPTG. 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 (Sambrook *et al.*, 1989). Para purificar el DNA de cadena sencilla de estas clonas, se inoculó 3.5 ml de medio LB fresco con 100 ml 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 16000 g durante 10 minutos, y los fagos presentes en el sobrenadante fueron precipitados con polietilenglicol al 4% y NaCl al 0.5 M (PEG). Las proteínas víricas fueron extraídas con fenol-cloroformo y el DNA fue sometido a precipitación etanólica.

G. *Secuenciación del DNA*. La reacción de secuenciación se llevó a cabo por el método de terminación de cadenas por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), utilizando el kit de secuencia versión 2.0 (U.S.B. Corporation). Las reacciones de secuenciación fueron sometidas a electroforesis en geles de acrilamida 6 y 4%, bisacrilamida 0.4% y urea 50% en TBE. Las clonas obtenidas del tamizaje de las bibliotecas fueron secuenciadas en ambas direcciones, mediante el diseño de oligonucleótidos sintéticos (Tabla I, pag. 37). Las clonas obtenidas para expresión fueron secuenciadas en los extremos para verificar la orientación y marco de lectura correcto. En el caso del DNA de plásmido, éste se desnaturalizó previamente como se describe por Barker (1993).

H. *Análisis de las secuencias*. Los análisis por computadora de las secuencias obtenidas fueron llevados a cabo con el programa PC/GENE (Intelligenetics, INC.). Las secuencias usadas en la alineación se encuentran disponibles en GeneBank (ver anexo 1). Las secuencias de aminoácidos se alinearon usando el algoritmo Clustal implementado en el programa DNAMAN (Lynnon BioSoft, 1994-1997); posteriormente la alineación se optimizó manualmente. En los análisis de inferencia filogenética se excluyeron las regiones altamente variables (ver la alineación usada en el anexo 2).

El análisis de inferencia filogenética por el método de Parsimonia se hizo con el algoritmo de "Branch-and-Bound" del programa PAUP (Swofford, 1990). La topología obtenida se evaluó con 100 réplicas de Bootstrap usando como grupos externos las secuencias LACPKL, QYANEU y MAL61Y (ver anexo 1). Las condiciones empleadas en el análisis con PAUP fueron las preestablecidas (default) en el programa.

Los análisis realizados con métodos de distancia se hicieron con el programa MEGA (Kumar *et al.*, 1993). Las distancias entre secuencias se calcularon con la fórmula de Distancia P,

y los árboles se construyeron con el algoritmo de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas.

I. *Elaboración de las construcciones de expresión en Xenopus.* La región codificadora completa de cada una de las TGTPs fueron amplificadas por PCR usando los oligonucleótidos TGTP1-X1 y TGTP1-X2 (para TGTP1) y TGTP2-XOA y TGTP2-XOB (para TGTP2), los cuales contienen en sus extremos 5' los sitios de restricción BamHI (TGTP1) y BglII (TGTP2). Los fragmentos de DNA obtenidos fueron purificados por afinidad al polvo de vidrio, digeridos y ligados en el vector de transcripción pSP64T (ver anexo 3), previamente digerido con BamHI, de tal forma que el RNA pudiera ser sintetizado *in vitro* a partir del promotor SP6 (Melton *et al.*, 1984). Se aisló por lo menos una clona positiva, orientada correctamente con respecto al promotor SP6, de cada una de las proteínas y el DNA de los plásmidos recombinantes fue purificado usando un kit para purificación de DNA plasmídico (BIGprep Plasmid DNA preparation Kit; 5PRIME → 3PRIME, Inc.), linearizado “downstream” de la secuencia de poliadenilación del vector, y utilizado para sintetizar RNA *in vitro* usando el mCAP mRNA Capping Kit (Stratagene Cloning Systems), según las instrucciones del fabricante con la excepción de que a cada reacción se le añadió 40 unidades de RNAsina y 40 unidades de SP6 RNA polimerasa de Promega (Skelly *et al.*, 1994).

J. *Elaboración de las construcciones para la expresión de las TGTPs en las células Sf9.*

i) *Subclonación en el vector pVL1393 y co-transfección con baculovirus en las células Sf9.* Para la expresión de las proteínas en este sistema, las secuencias codificadoras completas de TGTP1 y TGTP2 fueron amplificadas por PCR como se describe arriba (inciso I). Los fragmentos de DNA purificados por afinidad al polvo de vidrio, fueron digeridos con BamHI (TGTP1) y BglII, y subclonados en el vector de transferencia a baculovirus pVL1393 (ver anexo 3), previamente digerido con BamHI. Los plásmidos recombinantes conteniendo las secuencias de estas proteínas en orientación correcta fueron purificados usando el Kit para purificación de DNA plasmídico “BIGprep Plasmid DNA preparation Kit” (5PRIME → 3PRIME, Inc.), mezclados con el DNA del baculovirus (BaculoGold Baculovirus DNA, Pharmingen, Inc.) y usados para co-

transfectar la línea celular Sf9 con una suspensión de liposomas (Insectin, Invitrogen Corporation) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los baculovirus recombinantes fueron recuperados por centrifugación de los cultivos a 1000 g durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante conteniendo las partículas virales, fue almacenado a 4°C.

ii) Cultivo de las células de insecto Sf9. Las células de insecto fueron cultivadas en el medio Grace suplementado para células de insecto (GIBCO, BRL) con 10% de suero bovino fetal y 0.3% de gentamicina, e incubadas a 27°C. Para la infección con el baculovirus recombinante, se colocó las células en frascos de cultivo de 25 cm², y se dejaron adherir por 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se agregó 3-4 ml de medio de cultivo más la cantidad adecuada del sobrenadante que contenía las partículas virales. Para obtener alto título de virus, las células se incubaron a 27°C durante 72-96 h, mientras que para obtener las fracciones de membrana de las células infectadas, se recuperaron las células a las 48 horas de infección.

K. *Elaboración de las construcciones de las TGTPs en pRSET y pcDNA3.* Para la elaboración de las construcciones de las proteínas recombinantes completas y/o los péptidos correspondientes al asa externa que se forma entre las dos primeras regiones transmembranales (TGTP1, aa 1-93; TGTP2, aa 1-90), se usaron los vectores pRSET y pcDNA3 (ver anexo 3). Usando la mezcla de oligonucleótidos adecuada, se amplificó la región codificadora de cada proteína o fragmento de la misma a expresar. Para la proteína completa TGTP1 se usaron los oligonucleótidos TGTP1-X1 y TGTP1-X2. Para el fragmento amino terminal de esta proteína se usó TGTP1-X1 y TGTP1-X3A para la clonación en pRSET, y TGTP1-X1 y TGTP1-X3B para pcDNA3. Los oligonucleótidos usados para TGTP2 fueron TGTP2-XOA y TGTP2-XOB, y en el caso del fragmento amino se usó TGTP2-XOA y TGTP2-XOC para pRSET, y TGTP2-XOD y TGTP2-XOC para pcDNA3 (Tabla I, pag. 37). Los fragmentos de DNA obtenidos fueron purificados por afinidad al polvo de vidrio y dígidos en los extremos con las enzimas de restricción correspondientes para posteriormente ligarlos al vector previamente tratado (pRSET A para TGTP1, y pRSET B para TGTP2). La reacción de ligación se llevó a cabo toda la noche a 16°C, empleando la enzima DNA T4-ligasa según las instrucciones de la casa comercial (BioLab, Co.). Las bacterias competentes fueron transformadas por electroporación (ver inciso 3D) y se

crecieron en medio LB sólido con ampicilina (100 µg/ml) durante 24 h. Las clonas positivas orientadas correctamente fueron seleccionadas por ensayos de restricción y confirmadas por secuenciación de los plásmidos recombinantes en las regiones de ligación usando los oligonucleótidos pRSET-HU y pRSET-HUR en el caso del vector pRSET (Tabla I, pag.37).

3. MÉTODOS BIOQUÍMICOS E INMUNOQUÍMICOS.

A. Obtención de la fracción de membrana de células de insecto y tejido parasitario. Las fracciones de membrana fueron preparadas como se describe en Ramwani y Mishra (1986). Las células de insecto fueron resuspendidas en PBS con inhibidores de proteasas (TLCK 100 mM, PMSF 1mM y leupeptina 1 mM) a 4°C, y se sonicaron a 250 W por 15 segundos, tres veces. Se añadieron 10 volúmenes de sacarosa al 20% a la suspensión y se centrifugó a 1000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 100 000 g por 1 h a 4°C. El pellet fue resuspendido en amortiguador de corrida (SDS al 3%, urea al 4 M, glicerol al 10%, Tris-HCL al 100 mM, pH 6.8), y congelado a -20°C hasta su uso. La fracción de membrana de cisticercos fue preparada siguiendo la misma técnica con la excepción de que antes de la sonicación, los cisticercos congelados fueron homogenizados usando un Polytron (Brinkmann Instruments, Co.) a máxima velocidad por 1-2 minutos, a 4°C.

B. Cuantificación de proteínas. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el kit para dicho fin basado en la técnica de Bradford (1976), "Bio-Rad Protein Assay" (BioRad, Lab.). Se usó albúmina sérica bovina (BSA) como patrón.

C. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La composición polipeptídica de las fracciones obtenidas fue determinada por SDS-PAGE, usando geles al 10, 12.5 y 15% de acrilamida, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). La visualización de las bandas proteicas se realizó por tinción de los geles con azul brillante de Coomassie. Para la determinación de los pesos moleculares se utilizó una mezcla de proteínas globulares (Bio-Rad Lab., y/o Sigma) como patrones.

D. Electrotransferencia de proteínas. Previamente a la transferencia, se resolvieron por SDS-PAGE las bandas proteicas de las fracciones usadas. La cantidad de proteína aplicada por minigel fue de aproximadamente 100-150 mg de las fracciones de proteínas. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Towbin *et al.*, 1979). La transferencia se llevó a cabo a 1 amperio constante por 35 minutos. Para evaluar la calidad de la transferencia se tiñó el papel de nitrocelulosa con solución de Ponceau S (Sigma). El colorante fue lavado con abundante agua destilada. El papel de nitrocelulosa usado en las transferencias se recortó en tiras según los esquemas de ensayos a realizar:

i) Reconocimiento de proteínas por los Ac α -TGTPs. Las tiras fueron bloqueadas con leche descremada al 5% 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 minutos (cada vez) y se incubaron con los Ac α -TGTP1 o α -TGTP2 a diferentes diluciones en PBS-Tween 20 durante 1-2 h. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación constante. Se repitieron los tres lavados y se incubaron con un Ac 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 para ser reveladas con una solución que contenía orto-cloro naftol al 0.05%, metanol al 17%, PBS al 83% y H₂O₂ al 0.08%. La reacción fue detenida a los 10-15 min lavando las tiras con abundante agua destilada.

ii) Reconocimiento de las proteínas con sueros de pacientes neurocisticercosos, sueros de ratones infectados con *T. crassiceps* y sueros controles. Este reconocimiento se llevo a cabo en forma similar al reconocimiento con los Ac, sustituyendo la solución de bloqueo por BSA al 3% en PBS-Tween 20 al 0.05%. Los sueros se usaron en diluciones 1:50 y 1:100, y un Ac α -IgG humana (Zymed Lab, Inc.) acoplado a peroxidasa fue usado como segundo anticuerpo.

iii) Reconocimiento de las proteínas sobre el tejido parasitario. Los cortes de tejido sobre laminillas cubiertas con poli L-lisina se hidrataron con PBS pH 7.2, y se incubaron con suero normal de cabra al 20% en PBS por 30 minutos. Se lavó con PBS-Tween 20 al 0.15% e inmediatamente se incubaron durante toda la noche a 4°C con los Ac α -TGTP1c y α -TGTP2c en PBS-Tween 20 al 0.15%, BSA al 3%. Las laminillas fueron lavadas extensivamente con PBS-

Tween 20 al 0.15%, e incubadas en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente, con la fracción F(ab')₂ de la IgG α -conejo conjugada con fluoresceína (Boehringer Mannheim, Biochemicals) a una concentración de 2 mg/ml. Se lavaron las laminillas y se montaron con cubre-objetos usando PBS-glicerol en proporción 1:9. Los controles fueron incubados con segundo anticuerpo solamente. Las láminas fueron observadas inmediatamente y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Corporation).

E. Expresión funcional de las TGTPs en ovocitos de Xenopus. Ovocitos maduros de *Xenopus*, previamente aislados y purificados, fueron inyectados con aproximadamente 50 ng por ovocito del RNA previamente sintetizado y cuantificado (ver inciso 2J), y se incubaron a 18°C en medio Leibowitz L-15 al 50%, durante 48 h para permitir la expresión de las proteínas (Maller, 1983). Para medir el transporte basal se usaron ovocitos no inyectados por no presentar diferencias con los ovocitos inyectados con agua u otro DNA irrelevante (Skelly *et al.* 1994). Para realizar los ensayos de captación de glucosa por los ovocitos inyectados con RNA de las TGTPs, los grupos de 5-6 ovocitos fueron incubados por 1 h a temperatura ambiente en una solución amortiguadora (NaCl al 100 mM, KCl al 2 mM, MgCl₂ al 1 mM, CaCl₂ al 1mM, HEPES al 10 mM y Tris-HCl 50 al mM, pH 7.5) que contenía 2-desoxiglucosa al 0.1 mM, [1,2-³H]2-desoxiglucosa a 1 μ Ci/ml. Subsecuentemente, los ovocitos fueron lavados 5 veces a 4°C con el amortiguador de captación frío antes de ser solubilizados individualmente en SDS al 2% (Skelly *et al.*, 1994). La cantidad de radiactividad incorporada por cada ovocito fue medida en un contador de líquido de centelleo. El efecto de diversos azúcares a 10 mM (D-glucosa, L-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-fructosa y D-maltosa) y de ciertos inhibidores a 1 mM (ouabaina, floretina, florizina, citocalasina B) fue estudiado. Cuando se ensayó el efecto de los inhibidores, diferentes grupos de ovocitos fueron pre-incubados con cada uno de los compuestos 30 minutos antes de comenzar el ensayo de transporte. Para evaluar el efecto del sodio sobre el transporte de glucosa, el cloruro de sodio fue remplazado por cloruro de colina a 100 mM en el amortiguador de captación. Los experimentos se realizaron 2 veces, y los datos son presentados como la media +/- la desviación standard de la captación de por lo menos 4 ovocitos individuales, de un

experimento representativo. Los datos fueron comparados por la prueba "t" de Student de dos-colas ($p < 0.05$).

F. *Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.* Para la expresión de las proteínas, cultivos de toda la noche de las bacterias XL1-blue transformadas con los plásmidos recombinantes (ver inciso 2K) se diluyeron 1:50 en medio de cultivo SOB con $MgSO_4$ al 10 mM conteniendo 100 $\mu g/ml$ de ampicilina y se crecieron a 37°C en agitación constante hasta obtener una $OD_{600} = 0.3$. La expresión de péptidos de fusión se indujo con la adición al medio de IPTG 2 mM y una hora después el bacteriófago ayudador M13/T7, que aporta la polimerasa T7 necesaria para la producción de transcritos de la proteína de fusión. Para determinar el tiempo óptimo de expresión se hizo un análisis cinético de expresión de las proteínas recombinantes por corrimiento electroforético de lisados de bacterias inducidas y recolectadas a distintos tiempos a partir de la adición del IPTG. Se determinó la localización celular de los péptidos siguiendo las instrucciones del Manual "Xpress System Expression Description" (Invitrogen, Co.).

4. CITOQUÍMICA

Se obtuvieron cortes seriados de 6-8 μm de grosor de los tejidos parasitarios (cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps*; proglótidos maduros de *T. solium* y proglótidos grávidos de *T. saginata*), los cuales fueron colocados sobre láminillas previamente recubiertas con poli L-lisina al 0.01%, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Sigma). Las tinciones descritas abajo fueron realizadas siguiendo los procedimientos descritos en el manual "AFIP Laboratory Methods in Histotechnology".

Tinciones: Hematoxilina-Eosina

PAS (Schiff-ácido periódico)

Verhoeff's elastic stain

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos sintéticos diseñados para este trabajo de tesis.

| Nombre | Secuencia |
|-------------------|--|
| TGTP1-X1 | 5'-CGGGATCCACCATGAAAGGCATATCTGGC-3' |
| TGTP1-X2 | 5'-CGGGATCCTTGTCTACGGAGGT-3' |
| TGTP1-X3A | 5'-GCCGAATTCTAGTTCACCATCAGACTGCG-3' |
| TGTP1-X3B | 5'-GCGCTCGAGCTAGTTCACCATCAGACTGCG-3' |
| TGTP1-A | 5'-GCAAATCTGCCTGGAG-3' |
| TGTP1-B | 5'-GTTCTCACGGAGATTG-3' |
| TGTP1-C | 5'-CCAGCAAAC TGCCAC-3' |
| TGTP1-D | 5'-AGATCTTCGCATGCC-3' |
| TGTP1-E | 5'-CAACGCGGCGACTC-3' |
| TGTP1-G | 5'-GTTGGCGATATTGACG-3' |
| TGTP1-H | 5'-CACCCCTTCTGTTATGGCC-3' |
| TGTP1-I | 5'-CATGCCGGAGACAAAG-3' |
| TGTP2-XOA | 5'-CGCAGATCTACCATGGTTAACTTCCACTACG-3' |
| TGTP2-XOB | 5'-CGCAGATCTCTAGAATTTGACCCTATCGG-3' |
| TGTP2-XOC | 5'-CGCAAGCTTACCATGGTTAACTTCCACTACG-3' |
| TGTP2-XOD | 5'-GCGAATTCTAAAGAGACAGCTTTCGCCC-3' |
| TGTP2-XOE | 5'-CGCAGATCTACCATGAGTATTTCTTCCAGGGT-3' |
| GTP-2CG | 5'-CAGCAGTTCCTCCGGCAT(ACT)AA(CT)G-3' |
| GTP-3CG | 5'-TCGTGGAAGGTGCGGCCCTT(ACGT)GT(TC)TC-3' |
| GTP-4 | 5'-GCAGTTCACCTTACC-3' |
| GTP-5 | 5'-GGGCTCAATCCCCTGG-3' |
| GTP-6 | 5'-CCAGTATATCTCGCAG-3' |
| GTP-7 | 5'-GCTGCCTGACAAGCC-3' |
| GTP-8 | 5'-CCACACCCAAAGTCGC-3' |
| GTP-9 | 5'-GGATGAGTTTGTGCCG-3' |
| GTP-10 | 5'-AGGCTGCTCATTGCCTG-3' |
| GTP-11 | 5'-CCCCGTTACATTCTACTG-3' |
| GTP-12 | 5'-GTATCGCCTCGGAGCC-3' |
| pRSET-HU | 5'-TCATCATGGTATGGCTAGC-3' |
| pRSET-HUR | 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' |
| λ gt10 3' | 5'-GGGGATCCAAGCTTATGAGTATTTCTTCCAGGGT-3' |
| λ gt10 5' | 5'-GGCTGCAGAATTCAGTTCAGCCTGGTTAAGTCC-3' |

VI. RESULTADOS

Aislamiento y caracterización molecular de clonas de cDNA que codifican para transportadores de glucosa en T. solium (TGTPs). Para la clonación de los genes de transportadores de glucosa pertenecientes a la familia SP se siguieron principalmente dos estrategias. La primera consistió en diseñar oligonucleótidos degenerados a partir de regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos de transportadores de glucosa de mamíferos y del parásito platelminto *S. mansoni*. Los oligonucleótidos GTP-2CG y GTP-3CG fueron utilizados para amplificar por PCR un fragmento de DNA, el cual se usó como sonda en el tamizaje de la biblioteca de cDNA de cisticercos de *T. solium*. El fragmento de PCR obtenido de 500 pb permitió el aislamiento de una clona de 1703 pb con un marco de lectura abierto de 1500 pb y una región "downstream" de 156 nucleótidos donde se observa la señal de poliadenilación AATAAA (Rodríguez-Contreras, 1996). La secuencia de aminoácidos deducida corresponde a una proteína de 500 aminoácidos, con un masa molecular de 54.5 kDa (Fig. 7). Esta proteína muestra un 44-56% de similitud con transportadores humanos y los transportadores de glucosa de *S. mansoni* (Tabla II). Dada su mayor identidad (41.9%) y similitud (56%) con la proteína de *S. mansoni* SGTP2, se denominó a la proteína de *Taenia* TGTP2.

En un intento por obtener otras proteínas con estas características, se realizaron tamizajes de la biblioteca de cDNA del cisticercos de *T. solium*, usando una sonda heteróloga. Para lo cual se utilizó un fragmento de DNA de aproximadamente 1 Kb correspondiente a la región amino terminal que codifica para la proteína de *S. mansoni*, SGTP1 (Skelly *et al.*, 1994). El tamizaje realizado en condiciones de baja astringencia (50°C, 6X SSC) permitió el aislamiento de una clona de 2.1 kb, cuyos estudios de restricción llevaron a pensar que se trataba de una clona diferente a TGTP2. Para confirmar su identidad se subclonó en el vector M13 y se procedió a secuenciarla completamente. Los análisis de la secuencia de nucleótidos obtenidos revelaron un marco de lectura abierto de 1533 pb. La secuencia de aminoácidos deducida corresponde a una proteína de 510 aminoácidos con un peso molecular de 55 kDa, lo que sugiere que se trata de la secuencia codificadora completa de un transportador de glucosa (Fig. 8). Además, los análisis de hidrofobicidad sugieren la presencia de 12 regiones transmembranales, características de estas

TGTP2

-64 TGAATTGCGGGCCGGTTTTCAATTGGAAACCGTATGGAATCTGCTGTGATTGTCTCACATAA

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

101 TAATCGAAAAATACATCTTAAGCATATGTGAGGACAGAGGCAGTTCACCTTACCAGAGTTCGTTACAGCAATGAGCAGCCTCGTTCGTGGCTTTCC 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 P

201 GATAGCGGCATCTTTGGTGCATTGTTGGCGGATCTGTATCAAATAAAATGGGGCGAAAGCTGTCTCTTTTATCTTTAAACATCCGATGGCCGTTGGA 100
 I G G I F G A L E 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 TCCCTCTAATGATGGCTTGTCCAGGCAGCGGTAGTITTTGAAATGATATCGTGTGTAGAGTCTGTGGATTGGCTGTGGCTTCACTGGTATAG 133
 S L L M M A C Q A A V S F B M I I V G R V L V G F A C G A F T G I

401 CACCAGTATATCTCGCAGAAATCGCCCGAGTCAGGATGTGGTATGTGGGGATAATGCACCAATTTGGCCATTTGTCTGTGCCATTTCAATTTCTCAAAT 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 I S O I

501 CCTTGGTTGAAGGAATTAATGGGGTCGGCAAACTCTGGCTTATCTCTCCGGCCTGACAATCATACCCCTGGTCTCTATTTCTATTTTGATT 200
 L G L K E F L H G S A K L H P Y L L G L T T I I P S V V L L F L F M I

601 TGTCCAGACAGCCCCCGTTACATCTACTGAATAGTCAGGATCTCGAGAGTGGCAAATCTGCCCTTTTTGGCTCCGAGGCATACCGAAGTCGTTGAAG 233
 C P D S F 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 AGGAGATCGGGGAGCTCTTGGCTGAACAAGAGAAGCAAGCAAAATCATACTAAATTCGCCCTGAAAGCCTCTTTCGTGTCAAAGCTCTCGCGTTTGGC 267
 E E I G E L L A E Q E N E S E N H T K F P L R D L F R V K A L R L A

801 TCTCTCGCTCGCGTGTAGCCCACTTGGCCCAACAGTITTCGGGAATAAATGCTGCTCTCTTCTACTCCACTTCGCTATTGAAAGCATTTGGGCTCACC 300
 L P V A V V A H L A G Q F S G I N E A L F V S T S L F E S I G L T

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

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

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

1201 ATTTGTATCAGTCACTCGTCAATTTGGCTCGCTCAAAATGTTATCAGCTGGGATATCTCCCGCTTTTGAAGTCACTAAAGGACTACTCTTCTATGCCGT 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 R M P

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

1401 GACCGGCGGCGCAGAGGACGCTCACCTCGGCTCTACACTCGCTCCCTTCTCTAGTGAAGATGGCGAAATATGACGAAATCCGATAGGGTCAAATTC 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 TAGCGCCCTTCCCTCTCCCTCTCACCTCATCAAATGTAGTITTTATCGGAGACCTTTGCTTCTTTGGAGTCATGTTCTATTTCATATATTTTTTCT

1601 GGACAGATTTACTGACTTTAATAAAGTACTTGTATGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1723

Figura 7. Secuencia de nucleótidos completa y secuencia de aminoácidos deducida para TGTP2. El codón de iniciación (ATG) y el de terminación (TAG) se muestran en letras oscuras. Las 12 regiones transmembranales potenciales se muestran subrayadas (Eisenberg *et al.*, 1984).

TGTP1

-10 CCTACTGGAG

```

1 ATGAAAGGCATATCTGGCCACTAGTCTTTCAGCAATCTTCAGGACATGTTTGGGCTCATCTTCTCTGGGCTACAACCTGGGCGCTCGAAATCTGCCTG
  M K G I S G P L V L A I P T T C F G S S F L L G Y N L G V A N L P 33
101 GAGAFACATCAAGAAATTTCTGGTAACTACTACAAGCCGGACAACCTCATCTGCTTTGAAAGCCAACCTCTCTACGGACAGGTAACCTCCGCTGCTGGT
  G D N I K K F L V N V Y K P D N S S A L N A N F L Y G Q V T S V L Y 67
201 CATCTGTGCCCGCATGGCAGCTTCAGGTGGTGGTGGCTGACGGCCTGGGCAGAAAGCGCAGTCTGATGGTGAACAACGGCATTGGCATTGTGGGA
  T C A A A I A A F T C G H V A D G L G R K R S L M V N N G I G T V G 100
301 TCAGTAATCTCTCTGTGTGTGGTGGCAAACTCAGCTGCTTGTCTGTATGTGGGACGTGGGATCAGTGGTCTGAACAGCGGCTGAGCATTGGCATTG
  S V I S S V C V V A N Q P A L L Y V G R A T S G L N S G L S I G I 133
401 CAGCGATGTTCCTCAGCGAGATTGGCCACGCCATCTGCGGGCATGATTGGAGCTCGCAACCACTGGCTATCACCATCGSCATTGTCATCTCTCAGT
  A A M F L T E I A P R H L R G M I G A C N O L A I T I G I V I S Y V 167
501 GCTCACGCTGTGCGCCTTCTGAACACACCTACCTCTGGCCAGTGCCTGCGGCGTGGGCGCCATCTCGTCTGATCGCTCTCATTTCCTCCCTTC
  L T L S H L L N T P T L W F V A M G V G A I F A V I A L I I S P F 200
601 ACCGTGAGTCCCGCGTGGCTCTACTCTCAGAAGAAGGATGAGAAGCTGCGCGCGAAGCCTTCGCTCGCATCAATGGCTCCGASAAATGGGATATGT
  T V E S P R M L Y L K K D E K A A R E A P A R I N G S E N V D M 233
701 TCATCGCGAGATGCGTGAAGAGCTAGAGGTAGCCCAAGCAACAGAGTCAAATTTACTGAGCTCTCCGTCGCAGAGATCTTCGCATGCTCTGCAT
  F I A E M R E E L E V A Q N Q P E F K F T E L P R R R D L R M P V I 267
801 CATAGCGGTTCCTCATTCAAGTCATGCAGCAACTCTCAGGAATTAATGCTGTGGTGGCAATCTCGGAGATGTGAAAAGTGC AAGGTGTCGCCAGAC
  T A V L I Q V M O Q L S G I N A V V A N S S P E M L K S A K V S P D 300
901 ATGCTGGAGTACTTTGGTAGTCTGGGCCCTGCTCAACGTCATCTGCACANTCGTGGCGCTGCCGCTGCTGGAAAAAGCGGGTCCGGCGCACCTCTGT
  M L E Y F V V G L G L L N V I C T I V A L P L L E K A G R R T L L 333
1001 TATGGCCCTCCCTCGTAGTGGCAATAACTCTGCTGCTCTGCTGATCTTCGTCATATCGCCAACCTACGGAGGCGTGTAAACAAAGACGCCCTTCGCTCT
  L W P S L V V A T L L L L V I P V N I A N Y G V V N K T P P V L 367
1101 GCTTCTGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
  V S A V L V F I V V A A P A M G L G P M P A L I V A E I F R Q G P 400
1201 CGCGCGCGCCCTATTCCTCAGTCAAAGCATTGAGTGGGCTGCAATCTCATTGTCGTCAGCTCATTTCTCTCGCTCAACGAGCTATTAAAGGGCTACG
  R A A A Y S I S Q S I O N A C N L I V V A A S P E S N E L L K G Y 433
1301 TTTATCTGCGGTATCTGGTGTGGTGGCAGTTTGTGGGTGGTATTCTTCTCTCATGCGGAGACAAGAATCGCACCTTTGATGAGGTGGCACGGGA
  V Y L P V L V V V A V C M V V F F L F M P E T K N R T P D E V A R D 467
1401 TCTGGCTTCGGGAGCATCGTGGTGGTAAACGCACTGCGGGCTACAAGCTCCCGCTTTCACCAAGGAGGAGGAGGCGCTACCGCCCTCCGCGCG
  L A F G S I V V G K R T A A L Q A P V F T K E D E E A A T A L R R 500
1501 AGCGAGCAAGAGGACGCCAAGGTCGACGCTAGACTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
  S D E E D A K V D A 510
1601 GTGTCGCGTTTCCCCCATTCAGCAATTCAGTTCGCTCCATCTCTTTTACTCAACCTCGTAPAGCAAGGTACTCGGAGGCCAATCTCTCCCTCTCC
  1701 ATTCCTCTATAGATCGGAAGGTGAGTCAAGGATTTCCACCATAGTTTTTGTATGATGAAAAA 1766

```

Figura 8. Secuencia de nucleótidos completa y secuencia de aminoácidos deducida para TGTP1. El codón de iniciación (ATG) y el de terminación (TAG) se muestran en letras oscuras. El sitio potencial de N-glicosilación es mostrado con un asterisco (*). Las 12 regiones transmembranales potenciales se muestran subrayadas (Eisenberg *et al.*, 1984).

Tabla II. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE TGTP1 Y TGTP2 DE *Taenia solium* CON DIVERSOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA DE OTROS ORGANISMOS.

| Proteína * | TGTP1 (%) | | TGTP2 (%) | |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Identidad | Similitud | Identidad | Similitud |
| TGTP2 | 28.0 | 47.2 | - | - |
| GLUT1 | 31.9 | 49.2 | 37.2 | 53.0 |
| GLUT2 | 28.6 | 45.6 | 33.6 | 50.0 |
| GLUT3 | 30.8 | 48.8 | 37.3 | 53.6 |
| GLUT4 | 32.2 | 49.9 | 36.0 | 52.3 |
| GLUT5 | 29.7 | 45.3 | 31.7 | 49.7 |
| SGTP1 | 56.2 | 67.6 | 26.9 | 43.8 |
| SGTP2 | 25.2 | 42.1 | 41.9 | 56.0 |
| SGTP4 | 47.9 | 64.6 | 27.7 | 47.3 |
| DGTP1 | 30.8 | 47.2 | 37.7 | 55.4 |

TGTP1 y 2 son proteínas de *T. solium*; GLUT1, 2, 3, 4, 5 y 7 son proteínas humanas; SGTP1, 2 y 4 son proteínas de *Schistosoma mansoni*; DGTP1 es proteína de *Drosophila melanogaster*. Para calcular la similitud se tomaron los siguientes cambios conservados entre los aminoácidos: V,I,L,M; F,Y; D,E,N,Q; R,K; S,T (László, 1987).

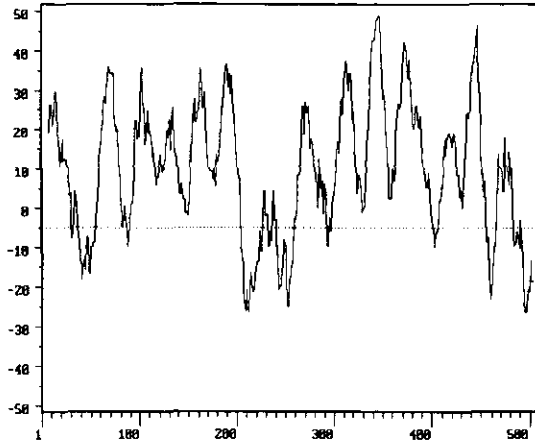
proteínas (Fig. 9). Su secuencia de aminoácidos muestra un 45-50% de similitud con los transportadores de glucosa de humano y un 42-67% con los transportadores de *S. mansoni* (Tabla II). Su mayor identidad (56.2%) y similitud (67.6%) con la proteína de *S. mansoni* SGTP1, nos llevó a denominarla TGTP1.

Las secuencias de aminoácidos de TGTP1 y TGTP2, deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos, codifican para proteínas con las características típicas de los miembros de la familia SP (Baldwin, 1993; Pao *et al.*, 1998). Son proteínas con PM promedio 50-55 kDa con 12 regiones transmembranales, asas relativamente grandes entre las regiones M1-M2 y M6-M7, ciertas regiones consenso (PESPR, QQ(L/F)SGIN, PETKX(R/K)T) y aminoácidos conservados a través de la secuencia (Fig. 10 y 11). El sitio potencial de N-glicosilación en el segmento extracelular entre los fragmentos que atraviesan la membrana M1 y M2, presente en la mayoría de los transportadores de esta familia en organismos eucariontes, solo está presente en TGTP1 (Fig. 8). La ausencia de este sitio ha sido reportada en transportadores de glucosa de plantas y protozoarios (Stack *et al.*, 1990; Langford *et al.*, 1994; Sauer y Tanner, 1989; Stadler *et al.*, 1995). Además de sus similitudes estructurales, ambas proteínas tienen niveles sustanciales de identidad y similitud con los miembros de esta familia (ver arriba). Estos resultados son apoyados por los análisis de inferencia filogenética, donde se demuestra que se trata de proteínas homólogas (Fig. 12 y 13).

En la búsqueda de clonas distintas se analizaron otras obtenidas del tamizaje para aislar TGTP2. La secuenciación de los extremos de la clona 8 de TGTP2, denominada TGTP2b, presenta un extremo amino terminal más largo (de 15 aa) que TGTP2 (Fig. 14). La secuenciación parcial de esta clona muestra un 100% de identidad con TGTP2. Aunque su caracterización es incompleta, podría tratarse de una isoforma de esta proteína. En este sentido, también se ha reportado heterogeneidad en el extremo amino terminal de transportadores de glucosa en *Leishmania* (Stein *et al.*, 1990; Langford *et al.*, 1994) y en GLUT4 de rata (Olson *et al.*, 1995).

Aunque el objetivo de esta tesis se enfocó al estudio de los transportadores de glucosa en el estadio larvario, es claro que la caracterización de otros miembros de la misma familia existentes en el adulto completaría el conocimiento del sistema en el parásito. En consecuencia,

TGTP1



TGTP2

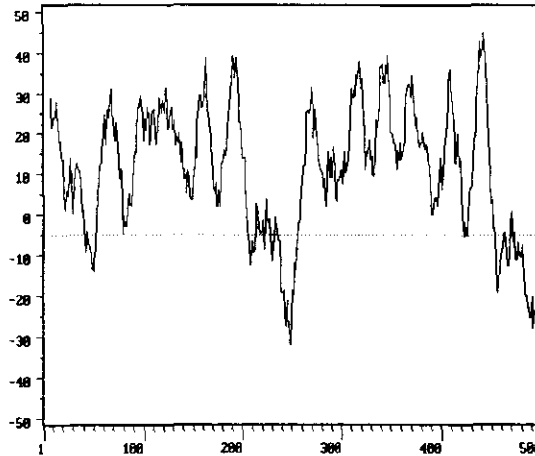
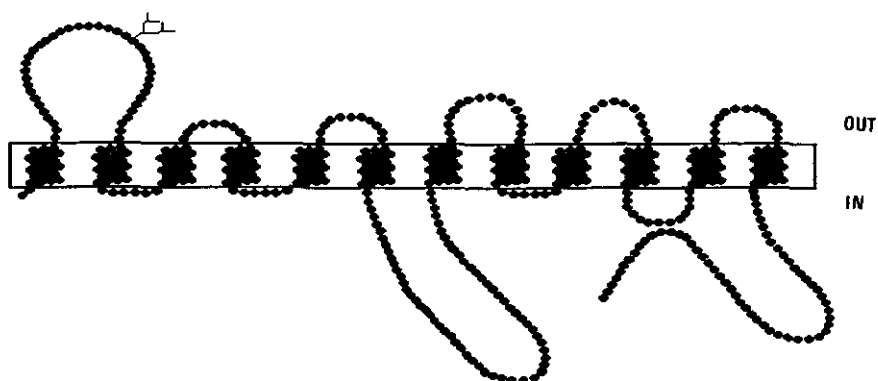


Figura 9. Perfiles hidropáticos de las secuencias de aminoácidos de TGTP1 y TGTP2. Los perfiles fueron derivados de acuerdo al algoritmo de Kyte y Doolittle (1982), usando una ventana de 15 aminoácidos (PC/Gene; Inteligenetics Inc.).

TGTP1



TGTP2

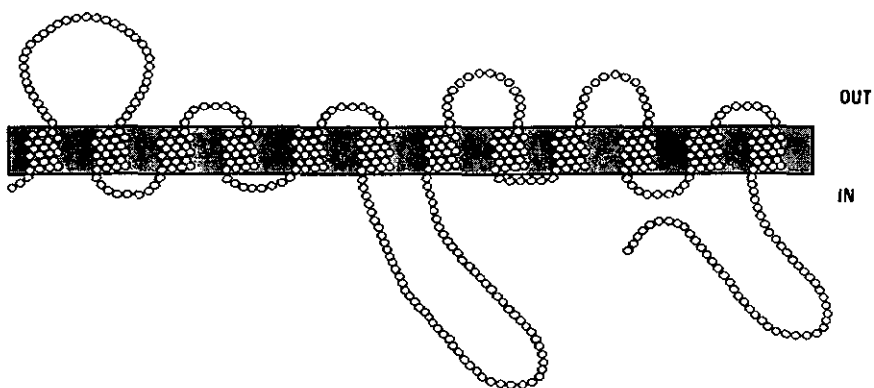


Figura 11. Representación esquemática de TGTP1 y TGTP2 en la membrana plasmática basada en el modelo de orientación propuesto para GLUT1 (Mueckler *et al.*, 1985). Cada círculo representa un aminoácido de las proteínas. El sitio potencial de N-glicosilación entre las regiones transmembranales M1-M2 en TGTP1 es mostrado.

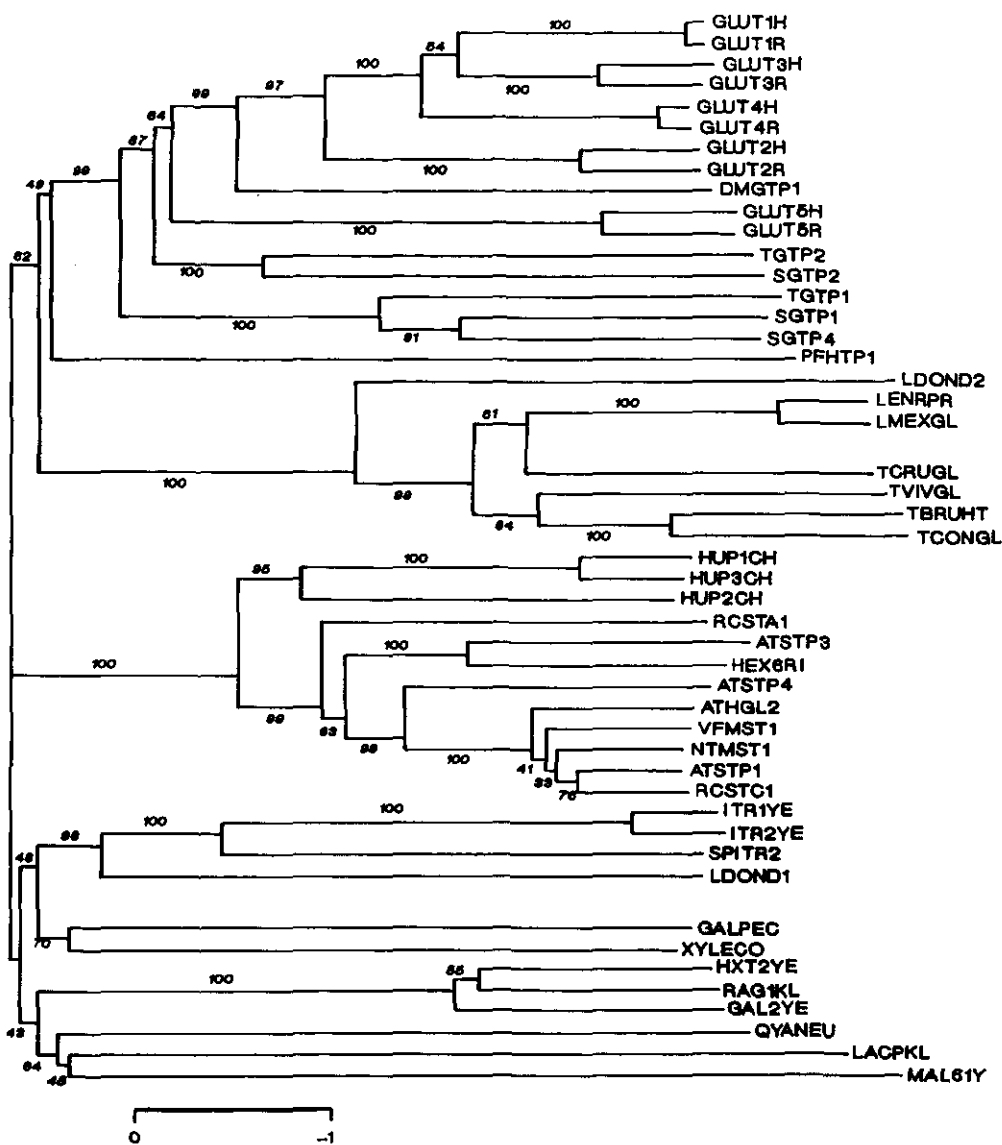


Figura 12. Árbol filogenético de los miembros de la familia SP (ver anexo 1), usando el método de Distancia-P (usando el programa MEGA). El árbol se construyó con el algoritmo de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas.

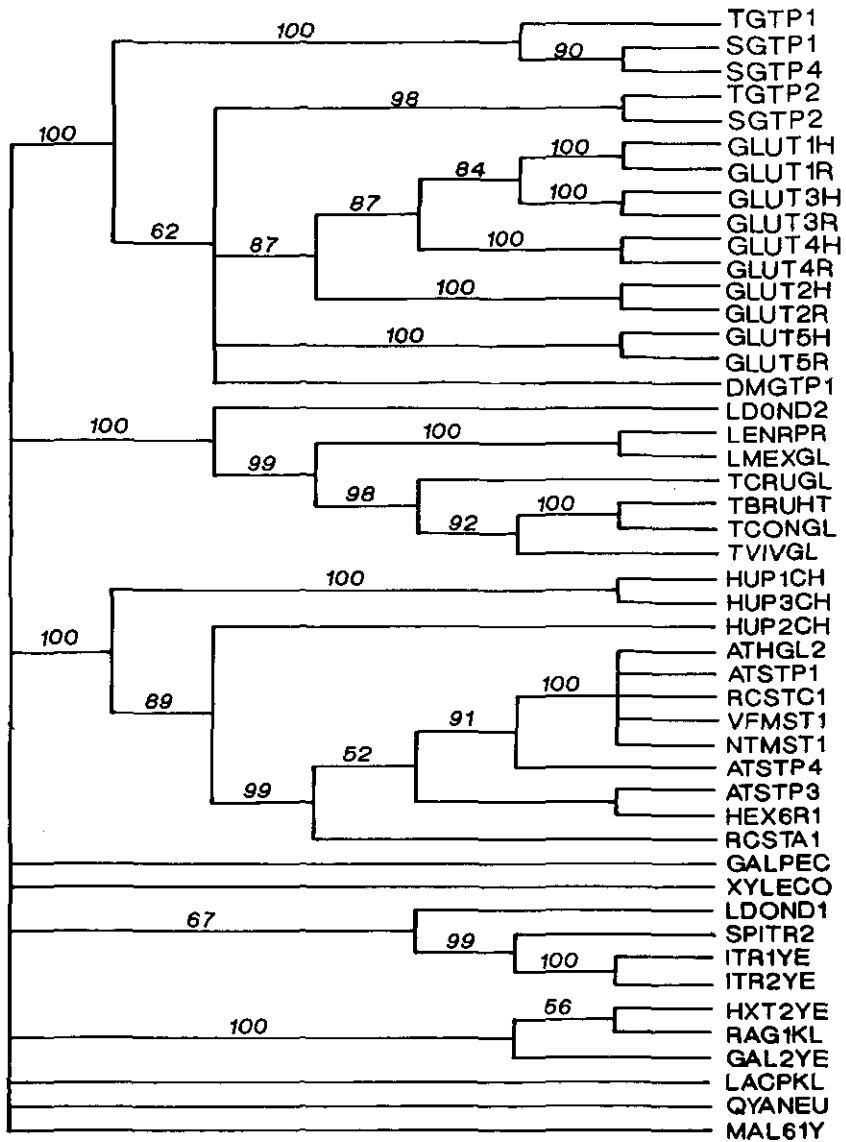


Figura 13. Árbol filogenético de los miembros de la familia SP (ver anexo 1), usando el método de Parsimonia (usando el programa PAUP). El árbol se construyó con el algoritmo de "Branch-and-Bound" con un Bootstrap de 100 réplicas.

TGTP2b

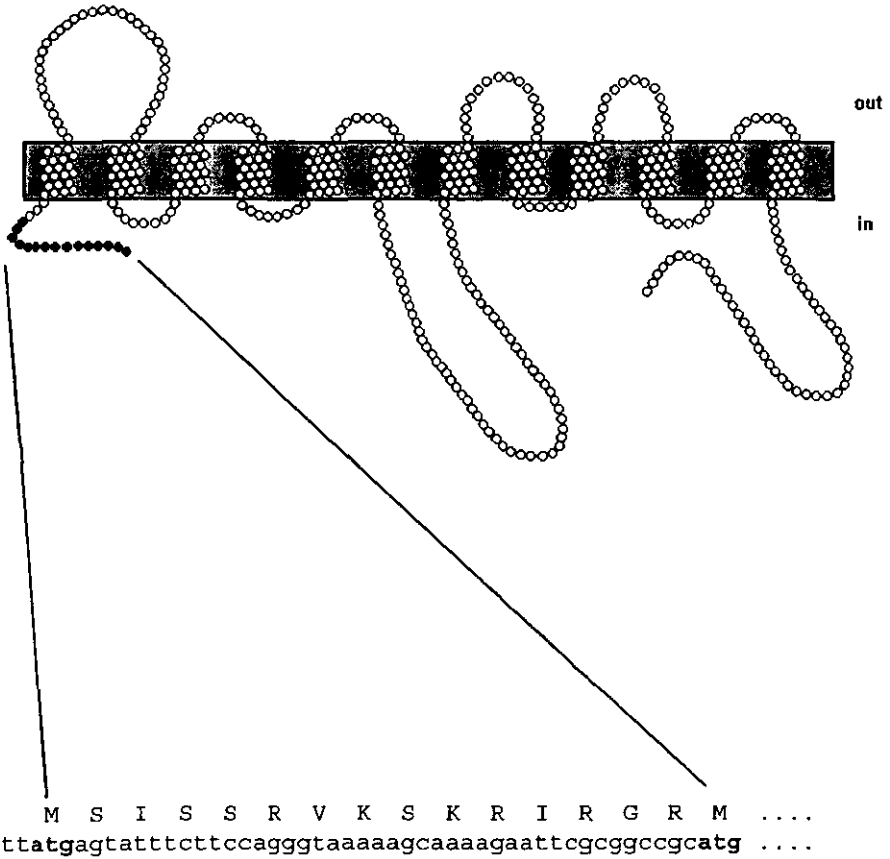


Figura 14. Representación esquemática de TGTP2b. Se muestra la secuencia de nucleótidos de la región amino terminal diferente con respecto a TGTP2, que genera un marco de lectura abierto de 15 aminoácidos extras.

se hizo un tamizaje de la biblioteca de cDNA del adulto de *T. solium* en condiciones de alta astringencia, usando como sonda la región codificadora completa de TGTP1 (obtenida por amplificación por PCR con los oligos TGTP1-X1 y TGTP1-X2). Mediante este procedimiento se aislaron y secuenciaron parcialmente varias clonas. Una de estas clonas resultó 100% idéntica a TGTP1, mientras que las clonas restantes (idénticas entre ellas) presentaban algunos cambios con respecto a TGTP1. Su secuenciación completa muestra 41 cambios en la secuencia de nucleótidos de la región codificadora representando un 97.33% de identidad en la secuencia de nucleótidos con respecto a TGTP1. Treinta y uno de estos cambios son silenciosos, es decir, no generan cambios en la secuencia de aminoácidos (Fig. 15). Los cambios ocurren en la tercera posición de los codones, con la excepción de un cambio que ocurre en la primera. De los 10 cambios restantes que generan cambios en la secuencia de aminoácidos, tres de ellos son conservados (Ile por Val; Val por Ile; Lys por Arg). Esta nueva clona es 98% idéntica y 98.6% similar a TGTP1 en la secuencia de aminoácidos deducida y seguramente es el resultado de un evento replicativo del gen para TGTP1. Al respecto, algunos transportadores de glucosa pertenecen a familias multigénicas en organismos eucariontes, presentando número variable de copias (Stein *et al.*, 1990; Bringaug y Baltz, 1993; Langford *et al.*, 1994; Waitumbi *et al.*, 1996).

Uso de codones. El conocimiento del uso de codones en céstodos puede ser de utilidad en el diseño de oligonucleótidos basados en la secuencia de aminoácidos, en la determinación del marco de lectura abierto de genes no identificados, e incluso, para mejorar la expresión de genes de *Taenia* en sistemas heterólogos. Este conocimiento se acumula conforme se caracterizan nuevos genes. La composición de nucleótidos para los genes de las TGTPs muestran un contenido de A+T en la región codificadora de 50.7% para TGTP1 y 45.3% para TGTP2, siendo mayor el contenido de A+T (62.5% y 52.4%, respectivamente) en la región no codificadora (Tabla III). Esto está en concordancia con lo reportado para los géneros *Taenia* y *Echinococcus* (Waterkeyn *et al.*, 1998; Kalinna y McManus, 1994), y contrario a lo que ocurre en el género *Schistosoma*, donde el contenido de A+T en la región codificadora es mayor del 60% (Meadows y Simpson, 1989). En ambos casos, la base menos usada en la región codificadora es la "A", mientras que en la región no codificadora es la "G". La frecuencia en el uso de codones para las

TGTPs es mostrada en la Tabla IV. La base G es favorecida en la primera posición, la T en la segunda posición y la C en la tercera posición (Tabla V). Los aminoácidos más usados por estas proteínas son Leu, Val, Ala, Ile, Gly, Ser, como ocurre con las proteínas de membranas con altos contenido de aminoácidos no polares (Haltia y Freire, 1995). Los aminoácidos menos usados son His, Trp, Cys (Tabla VI).

Tabla III. Composición de las bases nucleotídicas usadas por los genes de TGTP1 y TGTP2 en la región codificadora y no codificadora 3'.

| | TGTP1 | | TGTP2 | |
|----------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|
| | Región codificadora | Región no codificadora 3' | Región codificadora | Región no codificadora 3' |
| A (%) | 19.8 | 17.5 | 20.4 | 20.6 |
| T (%) | 25.5 | 35.9 | 30.3 | 41.9 |
| G (%) | 26.4 | 13.9 | 24.2 | 13.2 |
| C (%) | 28.0 | 32.7 | 24.8 | 24.3 |
| Nº nucleótidos | 1,533 | 223 | 1,503 | 136 |

Tabla IV. Uso de codones por los genes de las TGTPs.

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|----|-------|-----|-----|----|-------|-----|-----|----|-------|-----|-----|----|-------|
| TTT | Phe | 26 | 0.406 | TCT | Ser | 10 | 0.137 | TAT | Tyr | 8 | 0.286 | TGT | Cys | 10 | 0.714 |
| TTC | Phe | 38 | 0.594 | TCC | Ser | 16 | 0.219 | TAC | Tyr | 20 | 0.714 | TGC | Cys | 4 | 0.286 |
| TTA | Leu | 5 | 0.040 | TCA | Ser | 12 | 0.164 | TAA | --- | 0 | 0.000 | TGA | --- | 0 | 0.000 |
| TTG | Leu | 14 | 0.113 | TCG | Ser | 10 | 0.137 | TAG | --- | 2 | 1.000 | TGG | Trp | 11 | 1.000 |
| CTT | Leu | 18 | 0.145 | CCT | Pro | 16 | 0.356 | CAT | His | 3 | 0.429 | CGT | Arg | 10 | 0.250 |
| CTC | Leu | 39 | 0.315 | CCC | Pro | 6 | 0.133 | CAC | His | 4 | 0.571 | CGC | Arg | 15 | 0.375 |
| CTA | Leu | 13 | 0.105 | CCA | Pro | 11 | 0.244 | CAA | Gln | 12 | 0.462 | CGA | Arg | 4 | 0.100 |
| CTG | Leu | 35 | 0.282 | CCG | Pro | 12 | 0.267 | CAG | Gln | 14 | 0.538 | CGG | Arg | 5 | 0.125 |
| ATT | Ile | 31 | 0.360 | ACT | Thr | 9 | 0.237 | AAT | Asn | 18 | 0.500 | AGT | Ser | 11 | 0.151 |
| ATC | Ile | 44 | 0.512 | ACC | Thr | 14 | 0.368 | AAC | Asn | 18 | 0.500 | AGC | Ser | 14 | 0.192 |
| ATA | Ile | 11 | 0.128 | ACA | Thr | 8 | 0.210 | AAA | Lys | 15 | 0.455 | AGA | Arg | 4 | 0.100 |
| ATG | Met | 30 | 1.000 | ACG | Thr | 7 | 0.184 | AAG | Lys | 18 | 0.545 | AGG | Arg | 2 | 0.050 |
| GTT | Val | 24 | 0.224 | GCT | Ala | 26 | 0.268 | GAT | Asp | 12 | 0.480 | GGT | Gly | 19 | 0.244 |
| GTC | Val | 35 | 0.327 | GCC | Ala | 41 | 0.422 | GAC | Asp | 13 | 0.520 | GGC | Gly | 38 | 0.487 |
| GTA | Val | 13 | 0.121 | GCA | Ala | 15 | 0.155 | GAA | Glu | 17 | 0.354 | GGA | Gly | 14 | 0.179 |
| GTG | Val | 35 | 0.327 | GCG | Ala | 15 | 0.155 | GAG | Glu | 31 | 0.646 | GGG | Gly | 7 | 0.090 |

La primera fila de cada recuadro representan los codones; la segunda, el aminoácido para el cual codifica; la tercera, el número de veces que está el codón en las secuencias de TGTP1 y TGTP2; la cuarta, la frecuencia en que se encuentra cada codón con respecto al aminoácido que codifica.

Tabla V. Porcentaje de cada base en cada posición de los codones en las TGTPs.

| | 1 ^{era} posición | 2 ^{da} posición | 3 ^{era} posición |
|--------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| A (%) | 25.1 | 20.3 | 15.2 |
| T (%) | 18.4 | 40.6 | 24.8 |
| G (%) | 35.1 | 16.6 | 24.5 |
| C (%) | 21.4 | 22.5 | 35.5 |

Total de codones usados en el análisis: 1012. Los datos fueron extraídos de la Tabla IV.

Tabla VI. Frecuencia de los aminoácidos en las TGTPs.

| a.a. | Número | Frecuencia* | Posición† | a.a. | Número | Frecuencia* | Posición† |
|------------|--------|-------------|-----------|------------|--------|-------------|-----------|
| Ala | 97 | 0.096 | 3 | Leu | 124 | 0.123 | 1 |
| Arg | 40 | 0.040 | 10 | Lys | 33 | 0.033 | 13 |
| Asn | 36 | 0.037 | 12 | Met | 30 | 0.030 | 14 |
| Asp | 25 | 0.025 | 17 | Phe | 64 | 0.063 | 7 |
| Cys | 14 | 0.014 | 18 | Pro | 45 | 0.045 | 9 |
| Gln | 26 | 0.026 | 16 | Ser | 73 | 0.072 | 6 |
| Glu | 48 | 0.048 | 8 | Thr | 38 | 0.038 | 11 |
| Gly | 78 | 0.077 | 5 | Trp | 11 | 0.011 | 19 |
| His | 7 | 0.007 | 13 | Tyr | 28 | 0.028 | 15 |
| Ile | 86 | 0.085 | 14 | Val | 107 | 0.106 | 2 |

* La frecuencia fue tomada como el número de veces que se presenta el aminoácido entre el número total de aminoácidos que codifican a TGTP1 y TGTP1 (1010 aa).

† La posición se tomó de mayor a menor frecuencia.

Expresión funcional de las TGTPs en ovocitos de Xenopus. Para caracterizar funcionalmente estas proteínas como transportadores de glucosa, se utilizó el sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus*. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR la región codificadora de cada una de las TGTPs (ver métodos), las cuales fueron ligadas al vector pSP64T. Los plásmidos fueron linearizados y usados para sintetizar RNA *in vitro*. Los ovocitos fueron inyectados con el RNA codificante de cada una de las TGTPs e incubados por 48 h, para posteriormente realizar los ensayos de captación y medir la cantidad de 2-desoxiglucosa radiactiva tomada por los ovocitos en comparación con los controles. Como se muestra en la figura 16, los ovocitos inyectados con el RNA de TGTP1 tomaron significativamente más 2-desoxiglucosa que los controles, y la captación del azúcar siguió un patrón lineal durante 60 minutos, tiempo en el cual se observa una gran diferencia con los ovocitos controles. Los ovocitos inyectados con el RNA de TGTP2 no incrementaron la captación de 2-desoxiglucosa con respecto a los controles en 60 minutos de incubación, similar a lo previamente observado con su proteína similar en *S. mansoni*, SGTP2 (Skelly *et al.*, 1994). Este sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus* fue usado para caracterizar la especificidad de sustrato de TGTP1. En la figura 17A se muestran los ensayos de inhibición con azúcares a una concentración de 10 mM. El estereoisómero natural D-glucosa, pero no L-glucosa, compite efectivamente por el transporte de 2-desoxiglucosa. D-manosa inhibió la captación de forma similar a lo observado con D-glucosa, mientras galactosa y fructosa lo inhibieron en menor grado. Maltosa no inhibió significativamente la captación de 2-desoxiglucosa por TGTP1 ($p>0.05$). También se probaron algunos compuestos capaces de inhibir ciertos tipos de transporte. El inhibidor del transporte facilitado de glucosa, floretina (1 mM), abolió completamente el transporte de glucosa dependiente de TGTP1 (Fig. 17B). La citocalasina B, otro inhibidor del transporte facilitado, disminuyó el transporte de glucosa por esta proteína en un 80%. En contraste, no hubo diferencias en la captación de glucosa cuando los ovocitos fueron incubados en la presencia de la ouabaina, la cual bloquea los movimientos de sodio por las ATPasas/ Na^+ , inhibiendo el transporte activo de glucosa dependiente de sodio. Estos resultados demuestran que TGTP1 es un transportador facilitado de glucosa. Algo inesperado fue la moderada reducción de la actividad transportadora cuando el sodio no fue incluido en el medio y la clara sensibilidad a florizina, otro inhibidor del transporte de azúcar dependiente de sodio.

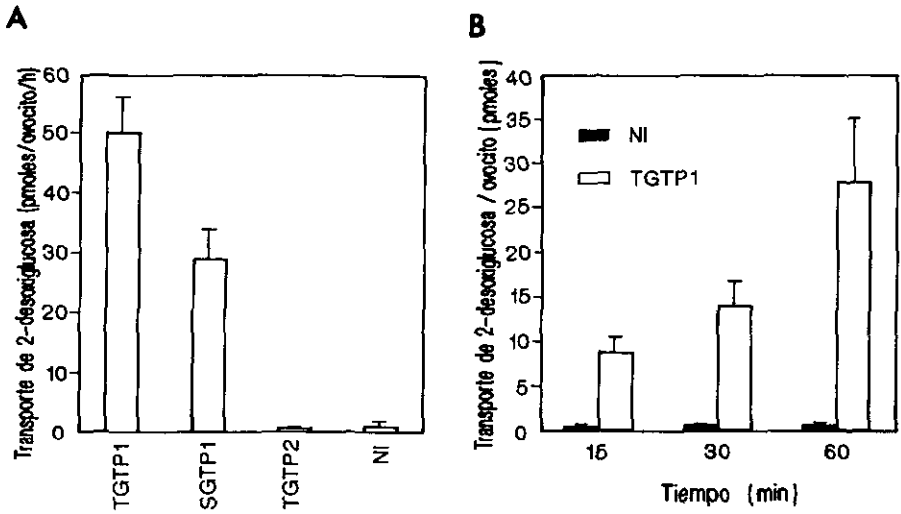


Figura 16. Expresión funcional de TGTP1 en ovocitos de *Xenopus*. **A.** Transporte de 2-desoxiglucosa por ovocitos inyectados con el RNA de TGTP1, TGTP2 y SGTP1. El transporte basal está representado por los ovocitos no inyectados (ver materiales y métodos). **B.** El transporte de 2-desoxiglucosa en función del tiempo por ovocitos inyectados con el RNA de TGTP1, comparado con los ovocitos controles (NI). Los datos son representados como la media \pm la desviación estándar del transporte de 4-6 ovocitos individuales de un experimento representativo.

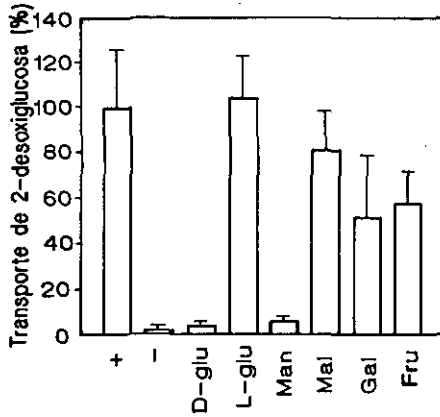
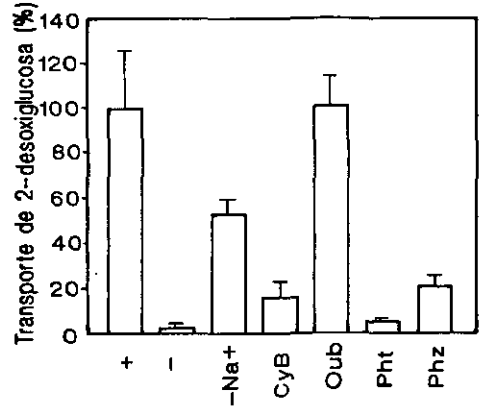
A**B**

Figura 17. Especificidad de azúcares y sensibilidad a inhibidores por los ovocitos inyectados con el RNA de TGTP1. **A.** Efecto de la competencia de azúcares (10 mM) sobre el transporte de 2-desoxiglucosa. D-GLU, D-glucosa; L-GLU, L-glucosa; MAN, D-manosa; MAL, D-maltosa; GAL, D-galactosa; FRU, D-fructosa. **B.** Inhibición del transporte de 2-desoxiglucosa por diversos inhibidores a 1 mM. -Na, ovocitos incubados en amortiguador carente de sodio; Cyt B, citocalasina B; Oub, ouabaina; Pht, floretina; Phz, floricina. Los valores de los ovocitos no inyectados (-) y los controles positivos (+) fueron obtenidos en la ausencia del azúcar o inhibidor en competencia. El transporte de 2-desoxiglucosa por los ovocitos inyectados con el RNA de TGTP1 en la ausencia de azúcares competidores o inhibidores fue tomado como 100%.

Inmunolocalización de las TGTPs en tejidos parasitarios. Las proteínas de esta familia poseen diferencias significativas en el tamaño y la composición de aminoácidos del asa que se forma entre los segmentos transmembranales M1-M2, 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 carboxilo terminal ha sido la más utilizada en la producción de Ac específicos contra estas proteínas para llevar a cabo inmunolocalizaciones (Haspel *et al.*, 1988; Zhong *et al.*, 1995; Langford *et al.*, 1995). Para la producción de Ac específicos para cada una de las TGTPs se sintetizaron los péptidos correspondientes a la región carboxilo terminal de ambas proteínas que comprenden los últimos 20 aminoácidos. Estos péptidos sintéticos fueron acoplados a albúmina, y utilizados para inmunizar conejos. Para los ensayos de inmunolocalización, los anticuerpos específicos fueron purificados por cromatografía de afinidad a los péptidos acoplados a ovalbúmina. Los anticuerpos obtenidos denominados α -TGTP1c y α -TGTP2c, reconocieron específicamente a su antígeno correspondiente (el péptido acoplado a ovalbúmina) por Western blot, sin observarse reconocimiento hacia el otro péptido, ni hacia la ovalbúmina sola (Fig. 18).

Para comprobar que estos anticuerpos eran capaces de reconocer a las proteínas completas, las TGTPs fueron expresadas en células de insecto, usando el sistema de expresión en baculovirus. Nuevamente, la especificidad de cada anticuerpo fue demostrada por Western blot usando fracciones membranales de las células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes, capaces de expresar cada una de las proteínas. En ambos casos, las proteínas fueron reconocidas específicamente por el anticuerpo correspondiente, es decir, no se observó reacción cruzada en el reconocimiento de TGTP1 y TGTP2 (Fig. 19).

Antes de realizar los ensayos de inmunolocalización, los Ac α -TGTP1c y α -TGTP2c fueron absorbidos con BSA, verificando el reconocimiento por Western blot de los anticuerpos hacia cada una de las proteínas expresadas en células de insecto después de la absorción de los mismos, así como su reconocimiento negativo hacia BSA. Posteriormente, los anticuerpos fueron usados en ensayos de inmunofluorescencia sobre cortes de tejido de diferentes especies y estadios de *Taenia*. Las muestras usadas en los ensayos fueron: cisticercos de *T. solium* y

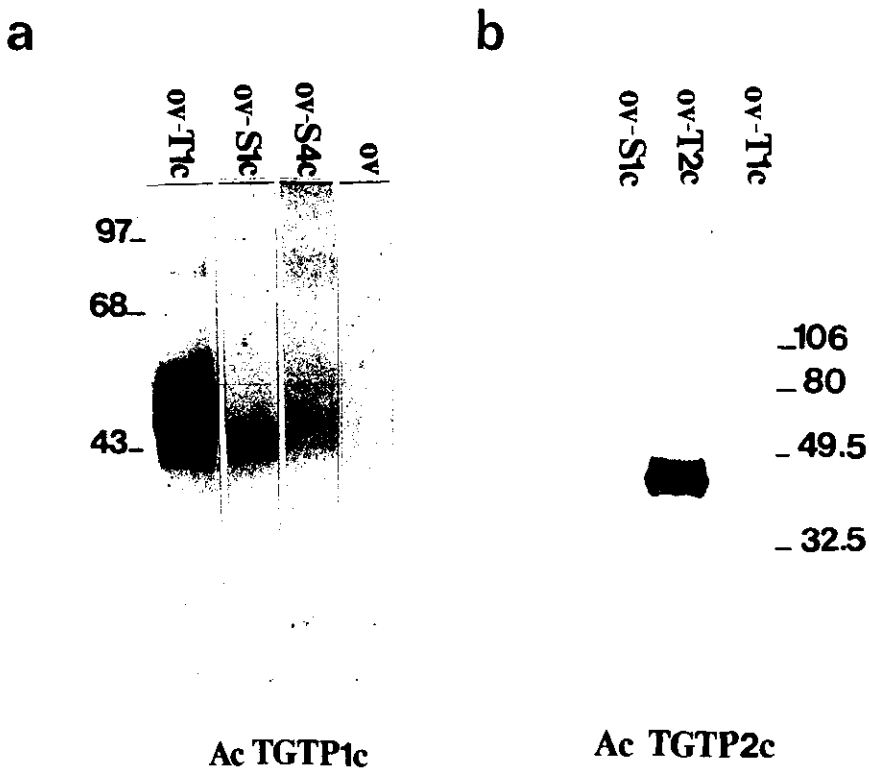


Figura 18. Reconocimiento hacia los péptidos sintéticos específicos acoplados a ovalbúmina por los Ac α -TGTP1 (a) y Ac α -TGTP2 (b) purificados por cromatografía de afinidad a BSA-péptido. Ov-T1c, ovalbúmina-péptido TGTP1; ovS1c, ovalbúmina-péptido SGTP1; ovS4c, ovalbúmina-péptido SGTP4; ovT2c, ovalbúmina-péptido TGTP2; ov, ovalbúmina.

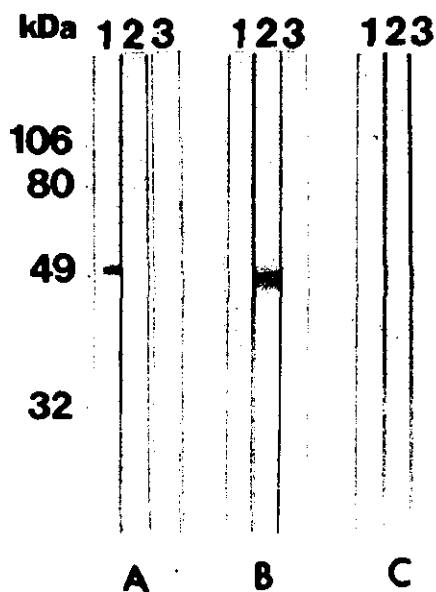


Figura 19. Expresión de TGTP1 y TGTP2 en el sistema de baculovirus. Western blot de la fracción membranal de las células de insecto Sf9-TGTP1 (1), Sf9-TGTP2 (2) y Sf9 (3) usando los Ac específicos α -TGTP1 (a) y α -TGTP2 (b). En (c) las tiras fueron incubadas sólo con el segundo anticuerpo. Las proteínas reconocidas tienen el tamaño esperado (45-50 kDa).

T. crassiceps, proglótididos de *T. solium* obtenidos de hámster, así como proglótididos grávidos de *T. solium* y *T. saginata* obtenidos de humano.

Inicialmente se hizo una tinción de hematoxilina-eosina para comprobar el buen estado de los tejidos a utilizarse en los ensayos de localización. El tejido proveniente del parásito adulto de *T. solium* obtenido de humano fue descartado del ensayo por recibirse en mal estado. Todos los demás tejidos fueron usados en los siguientes ensayos. Se realizaron cortes seriados de todos los tejidos, los cuales fueron sometidos a tinciones especiales que permiten identificar glucógeno y fibras elásticas. Además, se sometieron diversos cortes de cada tejido a los Ac α -TGTP1c y α -TGTP2c.

Los ensayos de inmunofluorescencia sobre cortes de tejido de la pared vesicular de cisticercos de *T. solium* mostraron que TGTP1 esta localizada en el tegumento así como en diversas estructuras por debajo de la membrana plasmática interna, incluyendo los citones tegumentarios y otros tipos celulares (Fig. 20). Observaciones similares fueron hechas en los estudios de localización con cisticercos de *T. crassiceps* (Fig. 20). La inmunolocalización de TGTP1 sobre el tejido de parásito adulto de *T. solium* y *T. saginata* también demostró su localización en estructuras relacionadas al tegumento, similar a lo observado en el estadio larvario (Fig. 21). A mayor aumento se puede observar una asociación en parches sugiriendo una asociación de TGTP1 a los canales tegumentarios y los citones. Esta proteína también fue visualizada sobre secciones de huevos dentro del útero de los proglótididos grávidos de *T. saginata*, en el vitelo y en la membrana oncosferal. Esta fluorescencia no se observó en los cortes de tejido tratados con el anticuerpo α -TGTP2 o en los controles. Estos resultados sugieren que TGTP1 está involucrada en la captación de glucosa dentro de una diversidad de estructuras internas relacionadas al tegumento de *T. solium* en todos los estadios de desarrollo, siendo su papel similar en todos ellos.

En los ensayos de localización con TGTP2 sobre cortes de tejido de cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps* se observa una fluorescencia intensa en la superficie externa del tegumento, diferente a lo observado para TGTP1. Además, TGTP2 no se localizó en el tegumento de los parásitos adultos de *T. solium* y *T. saginata* ni en los huevos dentro del útero de

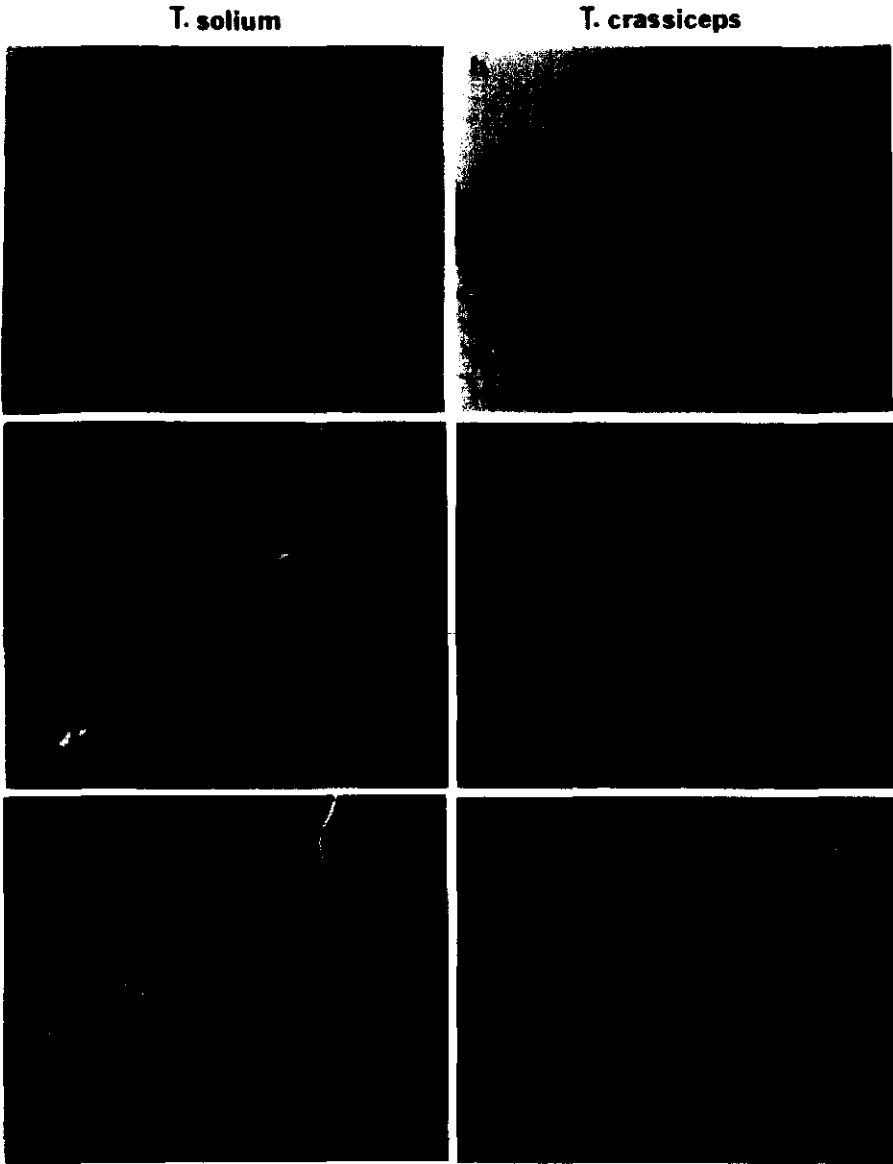


Figura 20. Inmunolocalización de TGTP1 y TGTP2 en secciones de tejido de cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps*. Las secciones de tejido fueron tratadas con HE (a y b), el Ac α -TGTP1 (c y d) o el Ac α -TGTP2 (e y f). Los controles incubados en ausencia del 1^{er} Ac no mostraron fluorescencia.

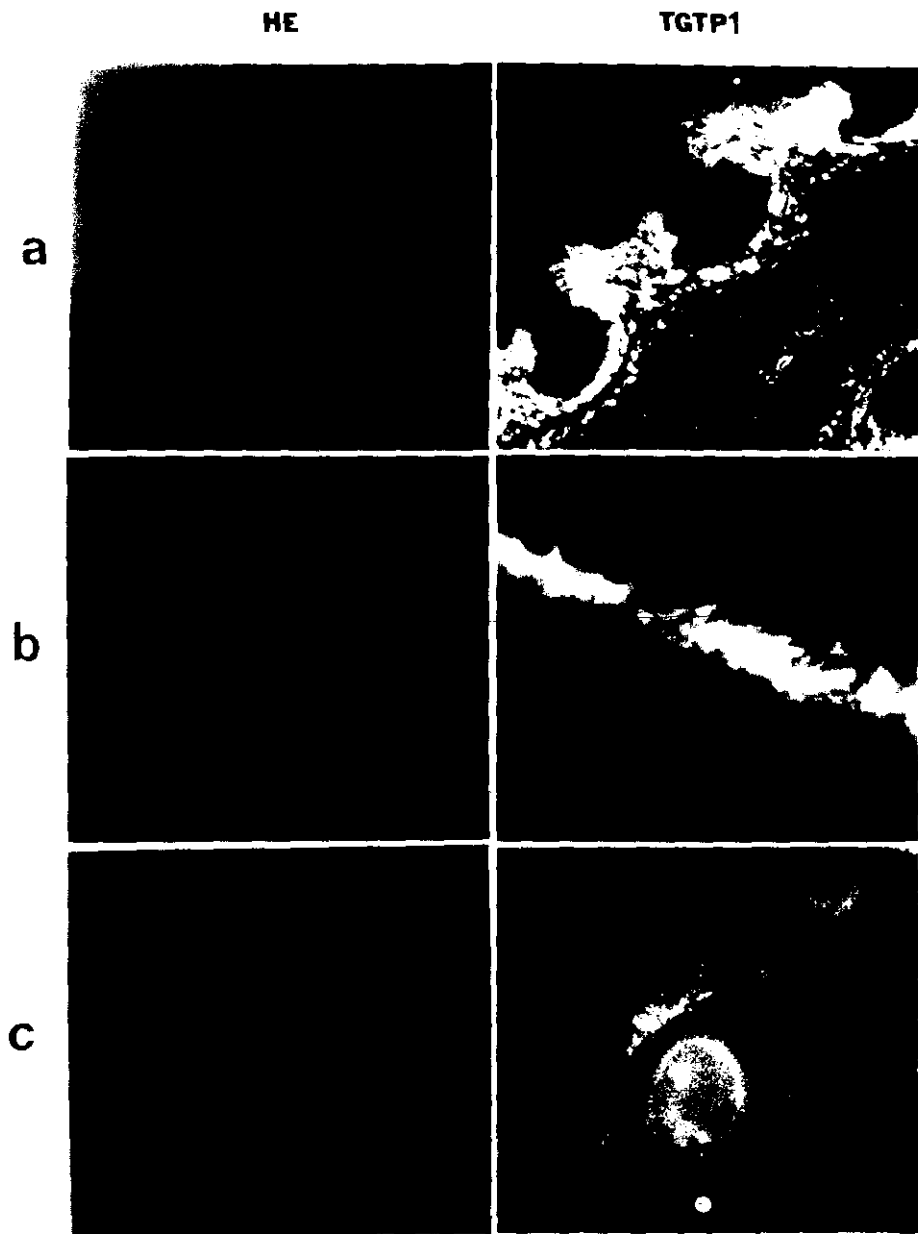


Figura 21. Inmunolocalización de TGTP1 sobre el tejido del parásito adulto de *Taenia*. Secciones de tejido de proglótidos de *T. solium* (a) y proglótidos grávidos de *T. saginata* (b y c) fueron tratadas con HE o con el Ac α -TGTP1. Secciones de tejido equivalentes incubadas con el Ac α -TGTP2 y en ausencia del 1^{er} Ac no mostraron fluorescencia (no mostrado).

los proglótidos grávidos de *T. saginata*, sugiriendo que su expresión es regulada en el desarrollo y restringida al estadio larvario.

Respuesta inmune contra las TGTPs. Para observar si los pacientes neurocisticercosos generan anticuerpos en contra de estas proteínas se realizaron ensayos de Western blot usando como antígeno las fracciones membranales de células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresaban cada una de las TGTPs. Como control se usó la fracción de las células de insecto no infectadas. Se probaron 30 sueros de pacientes con neurocisticercosis, teniendo como controles los sueros de pacientes con otros problemas neurológicos, negativos para neurocisticercosis. Los sueros fueron probados a diluciones 1:100 y 1:50. A esta última dilución se observó una respuesta hacia varias proteínas de las fracciones, sin embargo, ninguna de estas bandas corresponden a las TGTPs (Fig. 22). Estas bandas también son reconocidas por los sueros de los pacientes controles, correspondiendo a un reconocimiento hacia antígenos de las células de insecto y del virus (Fig. 23). Esto significa que los pacientes con neurocisticercosis no generan una respuesta inmune humoral contra las proteínas expresadas en el sistema de baculovirus y ensayadas por Western blot. Esto también fue observado cuando se ensayaron sueros de ratones infectados i.p. con cisticercos de *T. crassiceps* (Fig. 22). Posiblemente, estas proteínas no son presentadas al sistema inmune del huésped durante la infección.

Construcciones plasmídicas para la expresión de las TGTPs en bacterias y para ensayos de inmunización. Se intentó la expresión de las TGTPs completas y del polipéptido correspondiente al asa externa entre las regiones transmembranales M1 y M2 en un sistema bacteriano usando el vector pRSET. Para cumplir con este objetivo, se diseñaron oligonucleótidos específicos que permiten amplificar por PCR cada una de las secuencias señaladas anteriormente (ver Tabla I y sección de Materiales y Métodos). Los fragmentos de DNA purificados fueron ligados en el vector adecuado: pRSET A para TGTP1 y pRSET B para TGTP2. En la clonación de las proteínas completas en el vector pRSET se obtuvieron 2 construcciones con la orientación correcta para ambas proteínas, las cuales fueron verificadas por secuencia (BW1.31 y BW1.33 para TGTP1; BW2.2 y BW2.33 para TGTP2). Las

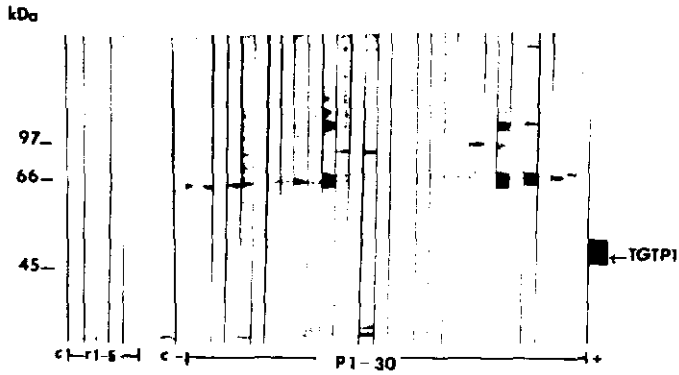
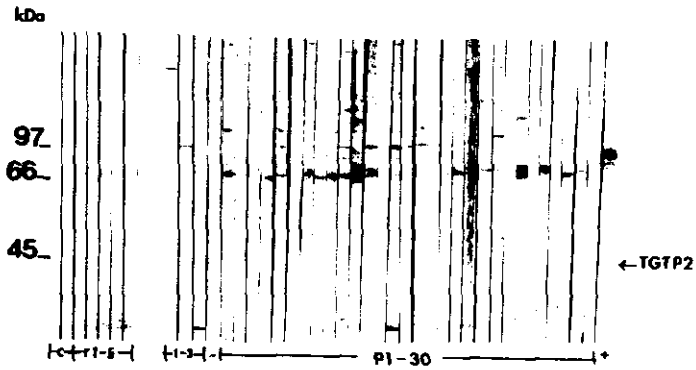
a**b**

Figura 22. Reconocimiento de las TGTPs por suero de pacientes con neurocisticercosis y suero de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps*. Western blot usando extracto de membrana de células de insecto expresando TGTP1 (a) y TGTP2 (b). P1-30, pacientes neurocisticercosos del n°1 al 30. R1-5, ratones infectados del n°1 al 5. El guión (-) representa una tira incubada con segundo anticuerpo. Las tiras restantes fueron incubadas con sueros controles de humano (1-3) o de ratón (c).

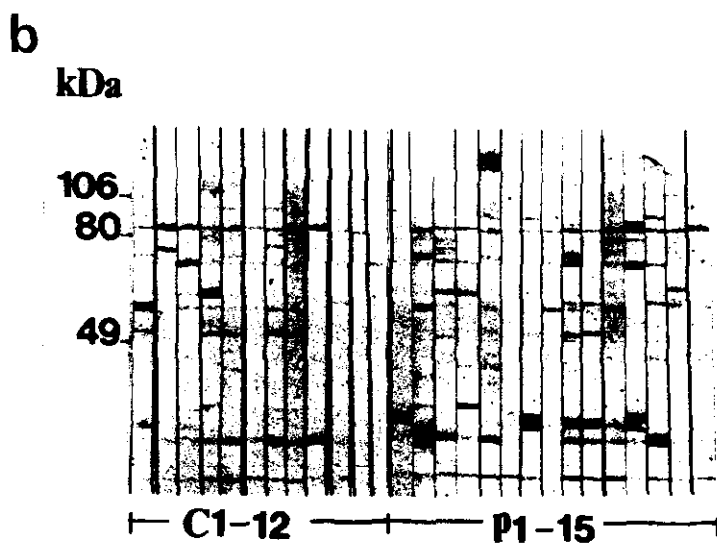
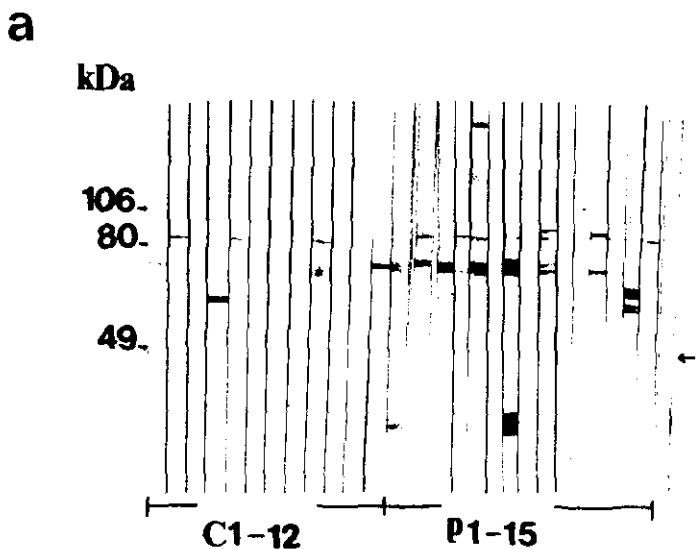


Figura 23. Reconocimiento de las TGTPs por suero de pacientes con neurocisticercosis. Western blot usando extracto de membrana de células de insecto expresando TGTP1 (a) o de células de insecto sin infectar (b). P1-30, pacientes neurocisticercosos del n°1 al 15. C1-12, pacientes con otros desórdenes neurológicos, negativos para neurocisticercosis.

construcciones obtenidas para el asa externa de estas proteínas fueron: CB1.5 y CB1.6 para TGTP1, y CB3.1, CB3.2, CB3.3, CB3.5, CB3.7 y CB3.8 para TGTP2. En este caso, solo las clonas CB1.5 y CB3.8 fueron secuenciadas. La elaboración de construcciones similares en el vector pcDNA3 quedó limitada a la obtención de una clona por proteína de la región amino terminal señalada. Las clonas obtenidas fueron: CB2.7 para TGTP1 y CA4.5 para TGTP2, aunque solamente la clona CA4.5 fue confirmada por secuencia usando el oligonucleótido GTP-10.

En los ensayos de inducción de las proteínas recombinantes a 37°C se observó la producción aumentada de una banda de tamaño esperado (45 kDa) en las clonas BW1.31 y BW1.33, correspondientes a TGTP1; sin embargo, este aumento también se observó en los controles no inducidos pudiendo indicar una expresión constitutiva o expresión de una proteína irrelevante. Este mismo patrón fue observado cuando las clonas se crecieron a 30°C. En ensayos de Western blot usando como antígeno los extractos bacterianos, el Ac α -TGTP1c no reconoció a esta proteína. En el caso de TGTP2, el crecimiento de las clonas BW2.2 y BW2.33 es muy pobre a 37°C mejorando notablemente cuando fueron incubadas a 30°C, sin embargo, no se observa la inducción de ninguna proteína. También se hicieron ensayos de expresión con las clonas CB1.5 (TGTP1) y CB3.8 (TGTP2), correspondientes al asa externa de estas proteínas. En este caso se observa la expresión aumentada de una proteína de tamaño esperado (aproximadamente 13-15 kDa), la cual no se presenta en los controles no inducidos. La inducción de estas proteínas se evidencia a las 4 horas, aumentando en incubaciones realizada durante toda la noche. Sin embargo, la identidad de estas proteínas no ha sido verificada.

VII. DISCUSIÓN

Los carbohidratos, principalmente la glucosa, son la principal fuente de energía metabólica de muchos tipos celulares en organismos eucariontes y procariontes. Sin embargo, su carácter hidrofílico les impide atravesar las membranas celulares por simple difusión, por lo que se han desarrollado una variedad de mecanismos para catalizar la captación de esas moléculas hidrofílicas a través de la membrana plasmática. La difusión facilitada es el mecanismo de captación de azúcares más ampliamente utilizado, la cual es manejada solamente por el gradiente de concentración a través de una membrana plasmática. Las proteínas encargadas de esta función pertenecen a una familia cuyos miembros muestran una estructura molecular común, pero difieren en ciertas características que les confieren selectividad y especificidad (Gould y Holman, 1993). Esto nos permitió diseñar estrategias para la clonación de dos genes que codifican proteínas con características típicas de los transportadores de azúcares por difusión facilitada. Estas proteínas fueron denominadas TGTP1 y TGTP2, por su mayor identidad con las proteínas de *S. mansoni* SGTP1 y SGTP2, respectivamente. Además de sus similitudes estructurales, ambas proteínas tienen niveles substanciales de identidad y similitud con los miembros conocidos de la familia SP. Las familias que componen la MFS generalmente están restringidas a un tipo específico de sustrato. Estas observaciones muestran que la especificidad de sustrato es un rasgo bien conservado y que la clasificación filogenética provee una guía limitada pero confiable para definir su función (Pao *et al.*, 1998). Para confirmar que los genes clonados no solo tienen similitud con las proteínas de esta familia, sino que se trata de proteínas homólogas, se realizaron análisis de inferencia filogenética donde se demuestra que las TGTPs tienen un origen común con los transportadores de glucosa por difusión facilitada de mamíferos y de *S. mansoni*.

Los resultados de los ensayos funcionales en los ovocitos de la rana *Xenopus* muestran que TGTP1 es un transportador de glucosa. Aunque no se puede descartar que sea capaz de transportar otros monosacáridos tales como galactosa o manosa, es poco probable que transporte algún disacárido. Dadas sus características moleculares es posible clasificarlo como un

transportador pasivo de glucosa, lo cual es apoyado por los resultados de los ensayos de expresión funcional en los que se determinó su sensibilidad a la citocalasina B y la floretina e insensibilidad a la ouabaina. La presencia de TGTP1 en los tres estadios del desarrollo de *T. solium* nos habla de una función relevante a lo largo del ciclo de vida del parásito. Esta proteína parece ser responsable de la distribución de glucosa hacia una variedad de estructuras de la pared vesicular. Posiblemente participa en la toma de glucosa hacia los citones tegumentarios y fibras musculares para ser usada como energía o para almacenarse como glucógeno en los compartimentos debajo del tegumento. En cambio, la presencia de TGTP2 únicamente en el estadio larvario nos sugiere un papel específico en esta etapa como adaptación al medio ambiente representado por los tejidos del huésped. TGTP1 tiene una localización en los tejidos similar a la encontrada para SGTP1 en el parásito adulto de *S. mansoni*, que es un parásito cercano a la *T. solium*. Los estudios de microscopía electrónica del parásito adulto de *S. mansoni* revelan que SGTP1 está localizada en la membrana interna del tegumento y posiblemente en la musculatura (Zhong *et al.*, 1995). Además, estudios de Northern blot revelan que SGTP1 se encuentra en todos los estadios del *S. mansoni* (Skelly *et al.*, 1994). Todas estas semejanzas entre TGTP1 y SGTP1, así como su similitud molecular y sus características de transporte nos llevan a proponer que TGTP1 es la proteína ortóloga de SGTP1. Es posible que TGTP2 sea la proteína ortóloga de SGTP2, sin embargo, no hay evidencias suficientes para apoyarlo. A pesar de su relación en los análisis filogenéticos y de su similitud molecular, se carecen de ensayos de localización de SGTP2 en *S. mansoni*. Si se logra dilucidar la especificidad de transporte de estas proteínas, se podría apoyar esta idea.

Los anticuerpos producidos hacia estas proteínas del cisticerco de *T. solium* tienen patrones de reconocimientos similares en otras especies del género *Taenia* como lo muestran los ensayos de localización en los tejidos de *T. saginata* y *T. crassiceps*. Hay una gran similitud en los componentes moleculares entre los miembros de la familia Taeniidae, como lo indican la similitud en los patrones electroforéticos de extractos proteicos parasitarios, contenido de carbohidratos y el alto nivel de reacciones cruzadas entre antígenos (Mills *et al.*, 1984; Sandeman y Williams, 1984; Joshua *et al.*, 1989; Larralde *et al.*, 1989; Lamsam y McManus, 1990; Liu *et*

al., 1992; Landa *et al.*, 1994; García *et al.*, 1995). En el caso de las TGTPs se usaron anticuerpos inducidos contra un péptido de una región variable dentro de las proteínas de la familia SP. Los anticuerpos producidos en contra de TGTP1 y TGTP2 no reconocen a los péptidos correspondientes de SGTP1 y SGTP2 de *Schistosoma*. Aunque no se han caracterizado las proteínas transportadoras homólogas en otras especies de *Taenia*, el reconocimiento cruzado de los ensayos de localización sugiere un alto grado de identidad.

Los ensayos de Western blot usando sueros de pacientes son uno de los procedimientos más usados para el diagnóstico inicial de neurocisticercosis (Feldman *et al.*, 1990). Se han descrito 31 polipéptidos del cisticerco de *T. solium* reconocidos por los sueros de pacientes con neurocisticercosis, de los cuales los antígenos con PM de 53, 45 y 41 kDa están entre los 10 más frecuentemente reconocidos (Grogl *et al.*, 1985). Cuando se usa una fracción de glicoproteínas purificadas con lectin-lectina, las proteínas más reconocidas tienen PM similares ($42 > 24 > 50$ kDa) (Tsang *et al.*, 1989; Felman *et al.*, 1990). A pesar de su interés diagnóstico, no se han caracterizado muchos de estos antígenos.

Las TGTPs tienen un PM cercano a algunos de los antígenos reconocidos en esta infección (PM de 50-55 kDa, pero migran en geles de SDS-PAGE como proteínas de 45-50 kDa), por lo que se evaluó el reconocimiento por pacientes con neurocisticercosis hacia estas proteínas expresadas en baculovirus por Western blot. Después de pruebas extensivas, ninguna de las TGTPs resultó reconocida por el suero de pacientes neurocisticercosos, indicando que no se trata de algunos de los antígenos mencionados arriba. La ausencia de reconocimiento hacia estas proteínas por los sueros de pacientes neurocisticercosos se puede explicar de diversas maneras. La destrucción de epítopes conformacionales debida a las condiciones desnaturalizantes propias del ensayo de Western blot. En el caso de TGTP2 que se encuentra en la superficie tegumentaria del parásito, su exposición al sistema inmune también podría estar impedida por el abundante glicocáliz presente en la membrana plasmática del tegumento. No hay que olvidar que se trata de proteínas con un alto porcentaje de regiones hidrofóbicas embebidas en la membrana, generalmente poco inmunogénicas. Además, muchas de sus regiones hidrofílicas expuestas en la superficie de las proteínas son pequeñas, y algunas de ellas son altamente conservadas con las

proteínas del huésped. El grado de similitud con las proteínas del huésped podría disminuir la respuesta inmune hacia estas proteínas. Sin embargo, se ha demostrado que algunas regiones de diversos transportadores de azúcares son antigénicas, lo que resulta en la generación de respuestas humorales incluso entre proteínas conservadas (Mueckler *et al.*, 1985; Thorens *et al.*, 1988; Nishimura *et al.*, 1992; Zhong *et al.*, 1995). En el caso de TGTP1 que está localizada internamente, su exposición al sistema inmune puede ocurrir al producirse daño parasitario, por ejemplo, en el tegumento. La respuesta humoral en cerdos cisticercosos está dirigida hacia componentes membranales, antígenos del fluido vesicular o productos de excreción/secreción (Larralde *et al.*, 1986; Lamsam y McManus, 1990; Ko y Ng, 1998). Además, alrededor del 65% de los componentes larvarios antigénicos son glicoproteínas, lo que sugiere que los motivos de carbohidrato tienen un papel en la antigenicidad de la larva de *T. solium* (Grogl *et al.* 1985). TGTP1 presenta el sitio potencial de N-glicosilación presente en muchas de las proteínas de la familia SP. Sin embargo, la ausencia de reconocimiento hacia la parte carbohidrato de TGTP1 puede deberse a una diferente glicosilación de la proteína expresada en células de insecto, con respecto a la proteína nativa. Otro factor a considerar es el nivel de anticuerpos presentes en el suero de los pacientes neurocisticercosos. En cerdos, los niveles y la especificidad de los anticuerpos varían dependiendo de la magnitud de la infección, de la duración de la infección e incluso por repetidas exposiciones al parásito (Aluja de *et al.*, 1996; Gracia-Allan *et al.*, 1996; Sciutto *et al.*, 1998; Aluja de *et al.*, 1999). A pesar de que los ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps*, no reconocen estas proteínas por Western blot, sería deseable investigar si en las infecciones masivas o avanzadas en cerdos, en que se observa una gran destrucción parasitaria, se mantiene la ausencia de reconocimiento hacia estas proteínas transportadoras.

Cada una de las familias incluidas en la superfamilia MFS reconocen y transportan una clase distinta de compuestos estructuralmente relacionados. La familia SP se ha diversificado para transportar una variedad de azúcares incluyendo hexosas, pentosas, disacáridos, quinatos, inositoles y cationes orgánicos (Pao *et al.*, 1998). A pesar de presentar diversidad funcional, los resultados de nuestros análisis de inferencia filogenética separan a los transportadores de hexosas de cada grupo de seres vivos, de los transportadores para los otros sustratos. Esta observación

unida al hecho de que las TGTPs se agrupan con los transportadores de monosacáridos de animales nos hace suponer que TGTP2 es capaz de transportar hexosas y/o pentosas aunque este análisis no permite deducir su especificidad. El análisis de las secuencias de aminoácidos de cada grupo de organismos apoyan la idea de que TGTP2 tiene una especificidad de azúcares diferente a TGTP1, SGTP1 y SGTP4.

Se ha propuesto que algunos motivos de la secuencia dentro de la séptima región transmembranal de los transportadores de glucosa en los mamíferos son importantes para determinar el azúcar transportado (D-glucosa o D-fructosa), así como la afinidad para el transporte de 2-desoxiglucosa (Arbuckle *et al.* 1996). Esta región tiene un alto grado de identidad entre casi todos los miembros de la familia SP, sugiriendo un papel importante en la función de transporte. Esta región también ha sido involucrada en los requerimientos para el transporte de fructosa en GLUT2 y GLUT5, aunque otras regiones de las proteínas también participan en el reconocimiento y transporte de este azúcar (Buchs *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998).

Los transportadores de glucosa que también transportan 2-desoxiglucosa con moderada o alta afinidad (GLUT1, 3 y 4) contienen la secuencia QLS precediendo la secuencia consenso QQ(L/F)SGIN en esta región. En contraste, el transportador de fructosa/glucosa de baja afinidad GLUT2, y el transportador de fructosa GLUT5 no contienen esta secuencia. Estudios usando quimeras de GLUT2/GLUT3 muestran que el reemplazo de la secuencia QLS en GLUT3 con la secuencia correspondiente a GLUT2 (HVA), resulta en una proteína capaz de transportar fructosa. Asimismo, la incorporación de la secuencia QLS en GLUT2 redujo su habilidad para transportar fructosa (Seatler *et al.*, 1998). Estos resultados demuestran que la presencia de la secuencia QLS está negativamente relacionada con la habilidad de transportar fructosa en los mamíferos y sugieren que esta región de la hélice está íntimamente involucrada en el reconocimiento de sustrato en el sitio de unión exofacial del transportador, por interacción con la posición C-1 de la molécula de azúcar. La secuencia QLS se encuentra en TGTP1, SGTP1 y SGTP4, pero no en TGTP2 o SGTP2, que poseen la secuencia HVA lo que sugiere que TGTP2 es un transportador de fructosa. En contraste, sería de esperar que TGTP1 sea incapaz de transportar fructosa, por lo que determinar experimentalmente si estas predicciones se cumplen, complementaría el presente proyecto de tesis.

En mamíferos, un gran porcentaje de los carbohidratos de la dieta proviene de la ingesta de almidón, sacarosa y otros azúcares, principalmente glucosa y fructosa. En el humano, la fructosa alcanza niveles de 6-8 mg/dl en sangre. El transportador de fructosa humano GLUT5 se expresa abundantemente en células epiteliales de intestino delgado y en espermatozoides maduros, donde participa en la absorción de fructosa de la dieta y de la presente en el fluido seminal, respectivamente (Burant *et al.*, 1992, Blakemore *et al.*, 1995). Además, esta proteína ha sido localizada en la membrana plasmática de células del músculo esquelético. La presencia de GLUT5 en el tejido muscular de humanos es consistente con estudios que demuestran que el músculo puede utilizar fructosa para llevar a cabo glicolisis y glicogénesis (Hundal *et al.*, 1998). En los céstodos, la utilización de fructosa ha sido pobremente estudiada. Se han realizado estudios sobre la utilización de diversos carbohidratos por los parásitos mantenidos *in vitro* por cortos tiempos. Los parásitos adultos no parecen utilizar fructosa ni manosa. En cambio, las larvas tienen un espectro ligeramente más amplio de utilización de hexosas aunque la absorción de fructosa y manosa es menor que de glucosa y galactosa (von Brand *et al.*, 1964; Smyth, 1969).

Si TGTP2 es un transportador de fructosa, entonces, debe haber un transportador de glucosa de alta afinidad en la superficie tegumentaria del cisticerco de *T. solium*, no clonado hasta el momento. Esta proteína sería la responsable de la toma de glucosa, y posiblemente de galactosa (hay indicios de que estos dos azúcares usan la misma vía de entrada en las larvas de los céstodos), que se observa cuando las larvas son incubadas *in vitro* con estos azúcares (Smyth, 1969). Es de esperarse que esta proteína tenga mayor identidad con TGTP1 que con TGTP2 (la identidad entre TGTP1 y TGTP2 es del 28%, mucho más baja que entre cada una de estas proteínas y las GLUTs). Un tamizaje de la biblioteca de cDNA del cisticerco de *T. solium*, usando como sonda el DNA de la región codificadora completa de TGTP1 o ciertas regiones de esta proteína conservadas en platelmintos, en condiciones de baja astringencia podría ser una buena estrategia para aclarar este punto. En cambio, en el parásito adulto donde el transporte de azúcar en la superficie tegumentaria se lleva a cabo por sistemas de transporte activo dependiente de sodio, se esperaría que la proteína responsable de internalizar la glucosa pertenezca a la familia de los transportadores sodio/soluto (SSF, sodium/solute symporter family), para la cual hay algunos

miembros caracterizados en mamíferos y bacterias, pero ninguno en parásitos (Reizer *et al.*, 1994).

En conclusión, el sistema de internalización de carbohidratos de la *T. solium* se puede resumir de la siguiente manera. La entrada inicial de glucosa y galactosa a la larva se da por una proteína de la familia SP (no caracterizada hasta el momento), mientras que la entrada de fructosa se lleva a cabo por otra proteína (posiblemente TGTP2). En contraste, en el parásito adulto, la entrada de glucosa se lleva a cabo por una proteína de la familia SSP como adaptación a los bajos y variables niveles de azúcar en el tubo digestivo. Dado que los adultos ténidos parecen no utilizar fructosa, no extraña la ausencia de TGTP2 en este estadio.

Una vez que la glucosa es internalizada a los tejidos del parásito, se distribuye a través de una variedad de tipos celulares que forman la pared vesicular. Posiblemente, TGTP1 juega un papel fundamental en esta distribución de glucosa en la pared vesicular del cisticerco, sin olvidar que la característica sincicial del tejido parasitario puede también contribuir. No se puede descartar la presencia de algún otro miembro de la familia SP en el tejido interno de estos parásitos tal vez mediando el transporte hacia estructuras más profundas en el parénquima tales como los genitales, el sistema de canales protonefridiales, el músculo, entre otros.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Hernández, A.** (1982). Economic impact of porcine cysticercosis in México. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 63-68.
- Aluja, A., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J.P., Larralde, C., Madrazo, I., Velázquez, X., Willms, K.** (1987). Cisticercosis: una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. *Fondo de Cultura Económica*. México.
- Aluja, A. y Vargas, G.** (1988). The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 28: 65-77.
- Aluja de, A.S., Villalobos, A.N., Plancarte, A., Rodarte, L.F., Hernández, M., Sciutto, E.** (1998). Experimental *taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet. Parasitol.* 61: 49-59.
- Aluja de, A.S., Villalobos, A.N., Plancarte, A., Rodarte, L.F., Hernández, M., Zamora, C., Sciutto, E.** (1999). *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet. Parasitol.* 81(2): 129-135.
- Ambrosio, J., Landa, A., Merchant, M.T., Laclette, J.P.** (1994). Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives Med. Res.* 25(3): 325-330.
- Arbuckle, M.I., Kane, S., Porter, L.M., Seatter, M.J., Gould, G.W.** (1996). Structure-function analysis of liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters: Expression of chimeric transporters in *Xenopus* oocytes suggests an important role for putative transmembrane helix 7 in determining substrate selectivity. *Biochemistry* 35: 16519-27.
- Arechavaleta, F., Molinari, J.L., Tato, P.** (1998). A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol.Res.* 84: 117-122.
- Arme, C., Middleton, A., Scott, J.P.** (1973). Absorption of glucose and sodium acetate by cysticercoid larvae of *Hymenolepis diminuta*. *J. Parasitol.* 59(1): 214.
- Arme, C.** (1988). Ontogenetic changes in helminth membrane function. *Parasitology* 96: S83-S104.
- Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J., Ishihara, H., Inukai, K., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Hirano, H., Yazaki, Y., Oka, Y.** (1991). The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 266(36): 24632-24636.

- Baldwin, S.A.** (1993). Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim.Biophys. Acta* 1154: 17-49.
- Barker, D.F.** (1993). A more robust, rapid alkaline denaturation sequencing method. *Biotechniques* 14(2): 168-9.
- Barrett, M.P., Tetaud, E., Seyfang, A., Bringaud, F., Baltz, T.** (1998). Trypanosome glucose transporters. *Mol. Biochem.Parasitol.* 91: 195-205.
- Bause, E.** (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* 209: 331-336.
- Benton, D. y Davis, R.** (1977). Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science*, 18: 180-182.
- Blakemore, S.J., Aledo, J.C., James, J., Campell, F.C., Lucocq, J.M., Hundal, H.S.** (1995). The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochem. J.* 309: 7-12.
- Bojalil, R., Terrazas, L.I., Govezensky, T., Scitutto, E., Larralde, C.** (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J.Parasitol.* 79: 384-389.
- Boles E. y Hollenberg, C.P.** (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol.Rev.*21:85-111.
- Boorer, K.J., Loo, D.D., Wright, E.M.** (1994). Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 20417-20424.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bringaud, F. y Baltz, T.** (1992). A potential hexose transporter gene expressed predominantly in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biol. Parasitol.* 52: 111-122.
- Bringaud, F. y Baltz, T.** (1993). Differential regulation of two distinct families of glucose transporter genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1146-1154.
- Buchs, A.E., Sasson, S., Joost, H.G., Cerasi, E.** (1998). Characterization of GLUT5 domains responsible for fructose transport. *Endocrinology* 139: 827-31.
- Burant, C.F., Takeda, J., BrotLaroche, E., Bell, G.I., Davidson, N.O.** (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J. Biol. Chem.* 267: 14523-26.

Burchmore, R.J. y Landfear, S. (1998). Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* 273: 29118-29126.

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

Cárdenas-Ramírez, L., Zaragoza, A.M., González del Pliego, M. (1982). Neural and Excretory Structures of *Cysticercus cellulosae*. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 281-306.

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

Correa, D., Dalma, D., Espinosa, B., Plancarte, A., Rabiela, M.T., Madrazo, I., Gorodezky, C., Flisser, A. (1985). Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J. Parasitol.* 71: 535-541.

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

Correa, D., Tovar, A., Espinoza, B., Plancarte, A., Flisser, A. (1989). 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.

Craig, P.S., Rogan, M.T., Allan, J.C. (1996). Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv.Parasitol.* 38: 169-250.

Davies, A., Meeran, K., Cairns, M., Baldwin, S. (1987). Peptide-specific antibodies as probe of the orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 262(19): 9347-9352.

Del Brutto, O.H. y Sotelo, J. (1988). Neurocysticercosis: an update. *Rev.Infect.Dis.* 10(6): 1075-1087.

Drew, M.E., Langford, C.K., Klamo, E.M., Russell, D.G., Kavanaugh, M.P., Landfear, S.M. (1995). Functional expression of a myo-inositol/H⁺ symporter from *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5508-5515.

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

Escobar-Izquierdo, A. (1989). 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.

Feldman, M., Plancarte, A., Sandoval, M., Wilson, M., Flisser, A. (1990). Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 559-562.

Feugeas, J., Néel, D., Goussault, Y., Derappe, C. (1991). Glycosylation of the human erythrocyte glucose transporter: a minimum structure is required for glucose transport activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1066: 59-62.

Fisher, F.M. Jr. y Read, C.P. (1971). Transport of sugars in the tapeworm *Calliobothrium verticillatum*. *Biol. Bull.* 140: 46-62.

Flisser, A. (1988). Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol. Today* 4(5): 131-137.

Flisser, A., Plancarte, A., Correa, D. (1991). *Taenia solium* cysticercosis: a review. *Res. Rev. Parasitol.* 51(1-4): 17-23.

Flisser, A., Madrazo, I., Delgado, H. (1997). *Cisticercosis humana. Manual Moderno, México*. pag. 1-176.

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

García-Allan, C., Martínez, N., Flisser, A., Aluja, A., Allan, J.C., Craig, P.S. (1996). Immunolocharacterization of *Taenia solium* oncosphere and metacestode antigens. *J. Helminthol.* 70: 271-80.

García-Noval, J., Allan, J.C., Fletes, C., Moreno, E., Mata de, F., Torres-Álvarez, R., Soto, H., Yurrita, P., Higueros-Morales, H., Mencos, F., Craig, P.S. (1996). Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural guatemalan communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55(3): 282-289.

Gould, G.W. y Holman, G.D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295: 329-341.

Graham, J.J. y Berntzen, A.K. (1970). The monoxenic cultivation of *Hymenolepis diminuta* cysticercoids with rat fibroblasts. *J. Parasitol.* 56(6): 1184-1188.

Grogl, M., Estrada, J.J., MacDonald, G., Kuhn, R.E. (1985). Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. *J. Parasitol.* 71(4): 433-442.

Haltia, T. y Freire, E. (1995). Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 295-322.

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

Haspel, H., Rosenfeld, M., Rosen, O. (1988). Characterization of antisera to a synthetic carboxyl-terminal peptide of the glucose transporter protein. *J. Biol. Chem.* 263(1): 398-403.

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

Hresko, R.C., Kruse, M., Strube, M., Mueckler, M. (1994). Topology of the GLUT1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269: 20482-20488.

Hundal, H.S., Darakhshan, F., Kristiansen, S., Blakemore, S.J., Richter, E.A. (1998). GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 41: 35-45.

Hustead, S.A. y Williams, J.F. (1977). Permeability studies on taeniid metacestodes: II. Antibody-mediated effects on membrane permeability in larvae of *Taenia taeniaeformis* and *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.* 63(2): 322-326.

James, D. y Piper, R. (1993). Targeting of mammalian glucose transporters. *J. Cell Science* 104: 607-612.

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

Kalina, B.H. y McManus, D.P. (1994). Codon usage in *Echinococcus*. *Exp. Parasitol.* 79: 72-76.

Kayano, T., Burant, C., Fukumoto, H., Gould, G., Fan, Y., Eddy, R., Byers, M., Shows, T., Seino, S., Bell, G. (1990). Human facilitative glucose transporters. *J. Biol. Chem.* 265(22): 13276-13282.

Ko, R.C. y Ng, T.F. (1998). Purification of larval *Taenia solium* antigens by isoelectric focusing. *Vet. Parasitol.* 74: 191-202.

Kumar S., *et al* (1993). MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, versión 1.0. *The Pennsylvania State University*, University Park, PA 16802.

Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-32.

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

Laclette, J.P., Rodriguez, M., Landa, A., Arcos, L., de Alba, P., Mancilla, R., Willms, K. (1989). The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leiden.* 57(2): 115-122.

Laclette, J.P., Shoemaker, C., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., Nicholson-Weller, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148(1): 124-128.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lamsam, S. y McManus, D.P. (1990). Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 101: 115-125.

Landa, A., Laclette, J.P., Nicholson-Weller, A., Shoemaker, C.B. (1993). cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.* 60: 343-348.

Landa, A., Merchant, M.T., Willms, K., Laclette, J.P. (1994). Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *Taenia solium* (Cestoda) cysticerci. *Int. J. Parasitol.* 24(2): 265-269.

Langford, C., Ewbank, S., Hanson, S., Ullman, B., Landfear, S. (1992). Molecular characterization of two genes encoding members of the glucose transporter superfamily in the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Parasitol.* 55: 51-64.

Langford, C., Little, B., Kavanaugh, M.P., Landfear, S. (1994). Functional expression of two glucose transporter isoforms from the parasitic protozoan *Leishmania enriettii*. *J. Biol. Chem.* 269(27): 17939-17943.

Langford, C., Kavanaugh, M., Stenberg, P., Drew, M., Zhang, W., Landfear, S. (1995). Functional expression and subcellular localization of a high- K_m hexose transporter from *Leishmania donovani*. *Biochemistry* 34: 11814-11821.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Larralde, C., Lacleste, J.P., Owen, C.S., Madrazo, I., Sandoval., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L. (1986). Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 965-73.

Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Diaz, M.L., Govezensky, T., Coltorti, E. (1989). Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 282-90.

Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C. (1995). Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 52(6): 575-80.

László, P. (1987). Detecting homology of distantly related proteins with consensus sequences. *J. Mol. Biol.* 198: 567-577.

Legapsi, T. (1998). La taeniosis/cisticercosis humana y porcina. *Epidemiología* 15(19): 1-2.

Leid, R.W., Suquet, C.M., Perryman, L.E. (1984). Inhibition of antigen- and lectin-induced proliferation of rat spleen cells by a *T. taeniaeformis* proteinase inhibitor. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 187-194.

Leid, R.W. y Suquet, C.M. (1986). A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 301-311.

Leid, R.W., Suquet, C.M., Bouwer, H.G., Hinrichs, D.J. (1986). Interleukin inhibition by a parasite proteinase inhibitor, taeniaestatin. *J. Parasitol.* 137: 2700-2702.

Leid, R.W. (1988). Parasites and Complement. *Adv. Parasitol.* 27: 131-168.

Liu, D., Rickard, M.D., Lightowlers, M.W. (1992). Comparative immunoelectrophoretic analysis of *Echinococcus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia pisiformis* cyst fluid antigens by hyperimmune rabbit sera. *Vet. Science* 53: 133-135.

Lumsdem, R. (1972). Cytological studies on the absorptive surfaces of cestode. VI. Cytochemical evaluation of electrostatic charge. *J. Parasitol.* 58(2): 229-234.

Lumsdem, R. (1975). Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp. Parasitol.* 37: 267-339.

Mahajan, R.C. (1982). Geographical distribution of human cysticercosis. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 39-46.

- Mahajan, R.C., Chopra, J.S., Ganguly, N.K.** (1982). Human cysticercosis and epilepsy: a serological study. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 171-178.
- Maiden, M., Davis, E., Baldwin, S., Moore, D., Henderson, P.** (1987). Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* 325: 641-643.
- Maller, J.L.** (1983). Use of microinjection techniques to study protein kinases and protein phosphorylation in amphibian oocytes. *Methods Enzymol.* 99: 219-226.
- Meadows, H.M. y Simpson, A. J.** (1989). Codon usage in *Schistosoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 291-293.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M.R.** (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 12(18): 7035-56.
- Merchant, M.T., Aguilar, L., Avila, G., Robert, L., Flisser, A., Willms, K.** (1998). *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J. Parasitol.* 84: 681-685.
- Mills, G.L., Coley, S.C., Williams, J.F.** (1984). Lipid and protein composition of the surface tegument from larvae of *Taenia taeniaeformis*. *J. Parasitol.* 70(2): 197-207.
- Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A., Cazares, J.M.** (1990). Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on culture human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 84(3): 205-208.
- Molinari, J.L., Tato, P., Lara-Aguilera, R., White, A.C. Jr.** (1993). Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J. Parasitol.* 79: 124-127.
- Moore, A.C., Lutwick, L.I., Schantz, P.M., Pilcher, J.B., Wilson, M., Hightower, A.W., Chapnick, E.K., Abter, E.H. Grossman, J.R., Fried, J.A., Ware, D.A., Haichou, X., Hyon, S.S., Barbour, R.L., Antar, R., Hakim, A.** (1995). Seroprevalence of cysticercosis in an orthodox jewish community. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(5): 439-442.
- Morales, E. y Cañedo, L.** (1982). *In vitro* study of the early transition of *Taenia solium* from metacestode to adult. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 495-498.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S., Panico, M., Blench, I., Morris, H., Allard, J., Lienhard, G., Lodish, H.** (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229: 941-945.

- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219: 713-725.
- Nishimura, H., Kuzuya, H., Kosaki, A., Okamoto, M., Kono, S., Inoue, G., Maeda, I., Imura, H. (1992). Monoclonal antibodies possibly recognize conformational changes in the human erythrocyte glucose transporter. *Biochem. J.* 281: 103-106.
- Oaks, J. y Lumsden, R.D. (1971). Cytological studies on the absorptive surface of cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. *J. Parasitol.* 57: 1256-1268.
- Olson, A.L., Edgington, N.P., Moye-Rowley, W.S., Pessin, J.E. (1995). Characterization of 5'-heterogeneity of the rat GLUT4/muscle-adipose glucose transporter gene product. *Endocrinology* 136: 1962-1968.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saier, M.H. Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(1): 1-34.
- Pappas, P.W. (1975). Membrane transport in helminth parasites: a review. *Exp. Parasitol.* 37: 469-530.
- Pappas, P.W. (1983). Host-parasite interface. En *Biology of the Eucestoda*. Arme, C. y Pappas, P.W. (eds). Vol. 2. Academic Press, New York.
- Pappas, P.W. y Read, C.P. (1973). Permeability and membrane transport in the larva of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 66: 33-42.
- Pappas, P.W. y Read, L. (1975). Membrane transport in the helminth parasites. *Exp. Parasitol.* 37: 469-530.
- Pearson, W.R. y Lipman D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448.
- Potter, K.A. y Leid, R.W. (1986). Isolation and partial characterization of an eosinophil chemotactic factor from metacestodes of *Taenia taeniaeformis* (ECF-Tt). *J. Immunol.* 136(5): 1712-1717.
- Rabiela, M.T., Rivas, H. A., Rodríguez, I.J. (1979). Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. *Patología* 17:119-136.
- Rabiela-Cervantes, M.T., Rivas-Hernández, A., Rodríguez-Ibarra, J., Castillo-Medina, S., Cancino, F. (1982). Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, 179-199.

- Ramírez-Bon, E., Merchant, M., González-del Pliego, M., Cañedo, L.** (1982). Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *T. solium*. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, 261-280.
- Ramwani, J. y Mishra, R.K.** (1986). Purification of bovine striatal dopamine D-2 receptor by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 261: 8894-8898.
- Read, C.P. y Simmons, J.E.** (1963). Biochemistry and Physiology of tapeworms. *Physiol. Rev.* 43: 263-305.
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H.Jr.** (1994). A superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1197: 133-66.
- Rickard, M.D. y Williams, J.F.** (1982). Hydatidosis/Cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv. Parasitol.* 21: 229.
- Roberts, L.S.** (1983). Carbohydrate metabolism. En: *Biology of the Eucestoda*. Arme, C. y Pappas, P.W. (eds). Vol. 2. Academic Press, New York, pag. 343-390.
- Roberts, T., Murrell, K.D., Marks, S.** (1994). Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. *Parasitol. Today* 10(11): 419-423.
- Rodríguez-Contreras, D.** (1996). Clonación y caracterización de genes que codifican para glicoproteínas de superficie de *Taenia solium*. *Tesis de Maestría*. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D.F.
- Rolfs, A., Muhlschlegel, F., Jansen-Rosseck, R., Martins, A.R., Bedaque, E.A., Tamburus, W.M., Pedretti, L., Schulte, G., Feldmeier, H., Kremsner, P.** (1995). Clinical and immunologic follow-up study of patients with neurocysticercosis after treatment with praziquantel. *Neurology* 45: 532-538.
- Rosen, R. y Uglem, G.L.** (1988). Localization of facilitated diffusion and active glucose transport in cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Int. J. Parasitol.* 18: 581-584.
- Rosen, R., San, M.L., Denton, M.E., Wolfe, J.M., Uglem, G.L.** (1994). The rapid development of the glucose transport system in the excysted metacestode of *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 108: 217-222.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sandeman, M. y Williams, J.** (1984). Lectin binding to cyst stages of *Taenia taeniaeformis*. *J. Parasitol.* 70: 661-667.

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

Sarti, E. (1989). Epidemiología de la teniasis/cisticercosis. En *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación*. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa, México. pag. 233-242.

Sarti, E. (1997). La teniasis y la cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México* 39(3): 225-231.

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

Sauer, N., Friedlander, K., Graml-Wicke, U. (1990). Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 9: 3045-3050.

Sauer, N. y Stadler, R. (1993). A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant. J.* 4: 601-610.

Schenone, H., Villarroel, F., Rojas, A., Ramírez, R. (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 25-38.

Sciutto, E., Fragoso, G., Baca, M., De la Cruz, V., Lemus, L., Lamoyi, E. (1995). Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Immun.* 63(6): 2277-2281.

Seatter, M.J., De la Rue, S.A., Porter, L.M., Gould, G.W. (1998). QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site. *Biochemistry* 37: 1322-26.

Shepherd, J.C., Aitken, A., McManus, D.P. (1991). A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosis* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 81-90.

Siebert, A.E. Jr., Blitz, R.R., Morita, C.T., Good, A.H. (1981). *Taenia crassiceps*: serum and surface immunoglobulins in metacystode infections in mice. *Exp. Parasitol.* 51: 418.

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

- Skelly, P.J. y Shoemaker, C.B. (1996). Rapid appearance and asymmetric distribution of glucose transporter at the apical surface of intramammalian-stage *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(8): 3642-6.
- Skelly, P.J., Tielens, A.G.M., Shoemaker, C.B. (1998). Glucose transport and metabolism in mammalian-stage schistosomes. *Parasitol. Today* 14(10): 402-406.
- Slais, J. (1970). The morphology and pathogenicity of the bladder worms. *Czechoslovak Academy of Sciences. Czechoslovakia*, pag. 13-50.
- Smyth, J.D. (1969). The physiology of cestode. *University Reviews in Biology*. Oliver and Boyd. 1-225.
- Smyth, J.D. (1994). Introduction to Animal Parasitology. 3rd ed. Cambridge University Press, Great Britain. Pag. 277-367.
- Sogandares-Bernal, F. y Voge, M. (1978). Immunoglobulins on the surfaces of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* Høepli 1925 (Cestoda), from laboratory infections of ICR mice. *J. Parasitol.* 64: 620-624.
- Stack, S., Stein, D., Landfear, S. (1990). Structural isoforms of a membrane transport protein from *Leishmania enriettii*. *Mol. Cell. Biol.* 10(12): 6785-6790.
- Stadler, R., Wolf, K., Hilgarth, C., Tanner, W., Sauer, N. (1995). Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H⁺ symporter and cloning of a co-induced galactose-H⁺ symporter. *Plant. Physiol.* 107(1): 33-41.
- Stein, D.A., Cairns, B.R., Landfear, S.M. (1990). Developmentally regulated transporter in *Leishmania* is encoded by a family of clustered genes. *Nucleic Acids Res.* 18: 1549-1557.
- Suquet, C.M., Green-Edwards, C., Leid, R.W. (1984). Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metacestode proteinase inhibitor. *Int. J. Parasitol.* 14: 165-172.
- Swofford, D.L. (1990). PAUP: Phylogenetic analysis using Parsimony, versión 4.0.0d61a. Beta version computer program. Laboratory of Molecular Systematics and pre-release testers.
- Tato, P., Castro, A.M., Rodriguez, D., Soto, R., Arechavaleta, F., Molinari, J.L. (1995). Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol. Res.* 81: 181-187.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84(1): 74-81.

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

Tetaud, E., Bringaud, F., Chabas, S., Barrett, M., Baltz, T. (1996). Hexose uptake in *Trypanosoma cruzi*: structure-activity relationship between substrate and transporter. *Biochem. J.* 317: 353-359.

Tetaud, E., Barrett, M.P., Bringaud, F., Baltz, T. (1997). Kinetoplastid glucose transporters. *J. Biochem.* 325: 569-580.

Thorens, B., Sarkar, H.K., Kaback, H.R., Lodish, H.F. (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells. *Cell* 55: 281-290.

Threadgold, L.T. y Befus, A.D. (1977). *Hymenolepis diminuta*: ultrastructural localization of immunoglobulin-binding sites on the tegument. *Exp. Parasitol.* 43: 169.

Towbin, H., Staehelin, T., Gorgon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sciences, USA* 70: 4350.

Trimble III, J.J. y Lumsdem, R.D. (1975). Cytochemical characterization of tegument membrane-associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J. Parasitol.* 61(4): 665-676.

Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J., Sauer, N. (1996). The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors and pathogen challenge. *Plant Cell* 8: 2169-2182.

Truernit, E., Stadler, R., Baier, K., Sauer, N. (1999). A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Plant J.* 17: 191-201.

Tsang, V., Brand, J., Boyer, A. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 159: 50-59.

Tsang, V. y Wilson, M. (1995). *Taenia solium* Cysticercosis: an under-recognized but serious public health problem. *Parasitol. Today* 11(3): 124-126.

Velasco-Suárez, M., Bravo-Becherelle, M.A., Quirasco, F. (1982). Human Cysticercosis: medical-social implications and economic impact. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 47-52.

- Verster, A.** (1969). A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus 1758 s. str. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 36: 3-58.
- Villa, O.F. y Kuhn, R.E.** (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 112: 561-570.
- von Brand, T., McMahon, P., Gibbs, E., Higgins, H.** (1964). Aerobic and anaerobic metabolism of larval and adult *Taenia taeniaeformis*. II. Hexose leakage and absorption; tissue glucose and polysaccharides. *Exp. Parasitol.* 15: 410-429.
- Waitumbi, J.N., Tetaud, E., Baltz, T.** (1996). Glucose uptake in *Trypanosoma vivax* and molecular characterization of its transporter gene. *Eur.J.Biochem.* 237: 234-239.
- Walmsley, A.** (1988). The dynamics of the glucose transporter. *TIBS* 13: 226-231.
- Walmsley, A.R., Barrett, M.P., Bringaud, F., Gould, G.W.** (1998). Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *TIBS* 23(12): 476-481.
- Waterkeyn, J.G., Gauci, C., Cowman, A.F., Lightowlers, M.W.** (1998). Codon usage in *Taenia* species. *Exp. Parasitol.* 88: 76-78.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N., Wobus, U.** (1997). A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908.
- White, A. Jr., Molinari, J.L., Pillai, A., Rege, A.** (1992). Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J. Parasitol.* 78(2): 281-287.
- Willms, K. y Arcos, L.** (1977). *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. *Exp. Parasitol.* 43: 396-406.
- Willms, K., Merchant, M.T., Arcos, L., Sealey, M., Díaz, S.** (1980). Immunopathology of cysticercosis. En *Molecules, cells and parasites in immunology*. Academic Press, Inc. New York, 145-162.
- Willms, K., Merchant, M.T., Díaz, S., Arcos, L.** (1982). Host-Parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*. En *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, Inc. New York, 397-410.
- Willms, K.** (1998). Cestodes (Tapeworms). *Infectious Diseases*. Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., Blacklow, N.R., Editors. Second edition, W.B. Saunders, Co. Philadelphia. Pag. 2481-2499.

Woodrow, C.J., Penny, J.I., Krishna, S. (1999). Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* expresses a high affinity facilitative hexose transporter. *J. Biol. Chem.* 274: 7272-7277.

Wu, L., Fritz, J.D., Powers, A.C. (1998). Different functional domains of GLUT2 glucose transporter are required for glucose affinity and substrate specificity. *Endocrinology* 139: 4205-4212.

Zhong C., Skelly, P., Cohn, R.G., Caulfield, L.P., Shoemaker, C.B. (1995). 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.

Zhou, A., Jiang, X., Xu, X. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8(2): 172-3.

Anexos

Anexo 1. Secuencias de transportadores usadas en el trabajo.

| Nombre | N° acceso GeneBank | Sustrato | Organismo | Referencias |
|---------|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---|
| TGTP1 | U39197 | Glucosa ?otros | <i>Taenia solium</i> | Rodríguez-Contreras et al., 1998 |
| TGTP2 | U62917 | monosacárido ? | <i>T. solium</i> | Rodríguez-Contreras et al., 1998 |
| SGTP1 | A53153 | Glucosa ?otros | <i>Schistosoma mansoni</i> | Skelly et al., 1994 |
| SGTP2 | B53153 | ? | <i>S. mansoni</i> | Skelly et al., 1994 |
| SGTP4 | C53153 | Glucosa ?otros | <i>S. mansoni</i> | Skelly et al., 1994 |
| GLUT1H | P11166 | Glucosa, otras aldosas | <i>Homo sapiens</i> | Kayano et al., 1990 Baldwin, 1993 |
| GLUT1R | P11167 | Glucosa | <i>Rattus norvegicus</i> | Pao et al., 1998 |
| GLUT2H | P11168 | Glucosa, fructosa | <i>H. sapiens</i> | Kayano et al., 1990 Baldwin, 1993 |
| GLUT2R | P12336 | Glucosa, fructosa | <i>R. norvegicus</i> | Pao et al., 1998 |
| GLUT3H | P11169 | Glucosa, galactosa, xilosa | <i>H. sapiens</i> | Kayano et al., 1990 Baldwin, 1993 |
| GLUT3R | Q07647 | Glucosa, ?otros | <i>R. norvegicus</i> | Pao et al., 1998 |
| GLUT4H | P14672 | Glucosa, ?otros | <i>H. sapiens</i> | Kayano et al., 1990 Baldwin, 1993 |
| GLUT4R | P19357 | Glucosa, ?otros | <i>R. norvegicus</i> | Pao et al., 1998 |
| GLUT5H | P22732 | Fructosa | <i>H. sapiens</i> | Kayano et al., 1990 Baldwin, 1993 |
| GLUT5R | 436579 | Fructosa | <i>Rattus rattus</i> | Pao et al., 1998 |
| DMGTP1 | AF064703 | ? | <i>Drosophila melanogaster</i> | |
| PFHTP1 | CAA10374 | Glucosa | <i>Plasmodium falciparum</i> | Woodrow et al., 1999 |
| LDOND2 | Q01441 | Glucosa | <i>Leishmania donovani</i> | Langford et al., 1995 |
| LENRPR | P13865 | Glucosa, fructosa >>manosa | <i>L. enrietti</i> | Langford et al., 1994 |
| LMEXGL | AF071217 | Glucosa, ?fructosa | <i>L. mexicana</i> | Burchmore y Langford, 1998 |
| TCRUGL | U05588 | Glucosa, fructosa | <i>Trypanosoma cruzi</i> | Tetaud et al., 1994, 1996 |
| TBRUHT | M81386 | Glucosa, ?fructosa | <i>T. brucei</i> | Bringaud y Baltz, 1993 |
| TCONGL | AF032096 | ? | <i>T. congolense</i> | |
| TVIVGL | L47540 | Glucosa, fructosa | <i>T. vivax</i> | Waitumbi et al., 1996 |
| HUP1CH | 2851499 | Glucosa, fructosa>manosa>galactosa | <i>Chlorella kessleri</i> | Stadler et al., 1995 |
| HUP2C11 | Q39524 | Galactosa, xilosa>glucosa>manosa | <i>C. kessleri</i> | Stadler et al., 1995 |
| HUP3CH | Q39525 | Glucosa, fructosa>galactosa | <i>C. kessleri</i> | Stadler et al., 1995 |
| ATSTP1 | P23586 | Glucosa, manosa, galactosa, xilosa... | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Boorer et al., 1994 Sauer et al., 1990 |
| ATSTP2 | S25009 | Galactosa, xilosa> glucosa, manosa | <i>A. thaliana</i> | Truernit et al., 1999 |
| ATSTP3 | CAA05384 | ? | <i>A. thaliana</i> | |
| ATSTP4 | S25009 | Glucosa, manosa galactosa, xilosa | <i>A. thaliana</i> | Truernit et al., 1996 |
| RCSTC1 | Q41144 | ? | <i>Ricinus communis</i> | |
| VFMST1 | CAB07812 | Glucosa, ?otros | <i>Vicia faba</i> | Weber et al., 1997 |
| NIMST1 | S25015 | Glucosa, xilosa, galactosa | <i>Nicotiana tabacum</i> | Sauer y Stadler, 1993 |
| HEX6R1 | Q07423 | ? | <i>R. communis</i> | |
| RCSTAI | Q10710 | ? | <i>R. communis</i> | |
| LDOND1 | Q01440 | Mio-inositol | <i>L. donovani</i> | Drew et al., 1995 |
| SPTR2 | P87110 | Mio-inositol | <i>Saccharomyces pombe</i> | Pao et al., 1995 |
| ITRIYE | P30605 | Mio-inositol | <i>S. cerevisiae</i> | Pao et al., 1995 |
| ITR2YE | P30606 | Mio-inositol | <i>S. cerevisiae</i> | Pao et al., 1995 |
| HXT2YE | P23585 | Glucosa, manosa, fructosa | <i>S. cerevisiae</i> | Boles y Hollenberg, 1997 |
| GAL2YE | P13181 | Galactosa>glucosa | <i>S. cerevisiae</i> | Boles y Hollenberg, 1997 |
| GALPEC | P37021 | Galactosa | <i>Escherichia coli</i> | Pao et al., 1998 |
| XYLECO | P09098 | Xilosa | <i>E. coli</i> | Pao et al., 1998 |
| RAGIKL | P18631 | Glucosa | <i>Kluyveromyces fragilis</i> | Boles y Hollenberg, 1997 |
| LACPKL | P07921 | Lactosa >galactosa | <i>K. lactis</i> | Boles y Hollenberg, 1997 |
| QYANEU | P11636 | Quinatos | <i>Neurospora crassa</i> | Pao et al., 1998 |
| MAL61Y | P15685 | Maltosa | <i>S. cerevisiae</i> | Pao et al., 1998 |

Anexo 2. Alineación de las secuencias empleadas en los estudios de inferencia filogenética.

TGTP1 a.a. 5 - 34

TGTP1 LVLAIFTTCFGSSFLLYNGLVANLPGDNI
SGTP1 LVLTVLITCVGSSFLIGYNLGVNLPRRNI
SGTP4 LSLSVLLACLGSSTFIGYNLGVNLPGENI
TGTP2 YVFATVVIIVFGSSFPQFGQTGVINSPLPLI
SGTP2 FFLPYCIITLGSFPFGYHTGVINAPADLI
GLUT1H LMLAVGGAVLGS-LQFGYNTGVINAPQKVI
GLUT1R LMLAVGGAVLGS-LQFGYNTGVINAPQKVI
GLUT3H LIFAITVATIGS-FQFGYNTGVINAPEKI I
GLUT3R LVFAVTVATIGS-FQFGYNTGVINAPETII
GLUT4H LVLAVFSAVLGS-LQFGYNIGVINAPQKVI
GLUT4R LVLAVFSAVLGS-LQFGYNIGVINAPQKVI
GLUT2H LVFTVITAVLGS-FQFGYDIGVINAPQQVI
GLUT2R LAFTVFTAVLGS-FQFGYDIGVINAPQEVI
GLUT5H LALATLIAAFGSSFPQYGNVAAVNSPALLM
GLUT5R LALATFLAAFSSFPQYGNVAAVNSPSEFM
PFHTP1 SEKYVLSACIAS-FIFGYQVSVLNTIKNFI
LDOND2 NLIVATPIILTP-LLYGNLGFVGPYSTMY
LENRPR NARVMLVQAIGG-SLNGYSIGFVGVYSTLF
LMEXGL NFRMIMVQAIGG-CLNGYSIGFVGVYSTLF
TCRUGL NLKVAQVQVVG- TLNGFSIGFVAVYAYFY
TBRUHT NLGVAQVQVVG- TLNGYVIGYVAVYLLLY
TCONGL NLGVVQVQVIGG- TLNGFSIGFVAVYMLLY
TVIVGL NLCIVQVPVSTG-SLNGFSIGFVAVYMHLY
DMGTP1 LTYSI FSAVLGM-LQFGYNTGVINAPEKNI
HUP1CH VVMVAFMAACGG-LLLGYDNGVTGGVVSLE
HUP2CH IFIVALTAGSGG-LLFGYDIGVTGGVTSMP
HUP3CH VLLVALVAACGG-MLLGYDNGVTGGVASME
ATHGL2 VTVTCIVAAMGG-LIFGYDIGISGGVTTMD
ATSTP1 VLFTCVVAAMGG-LIFGYDIGISGGVTSMP
ATSTP4 VVFTCFIGA FGG-LIFGYDLGISGGVTSME
ATSTP3 VVASCVMAAMGG-VIFGYDIGVSGGVMSMG
RCSTC1 VVTCVVAAMGG-LIFGYDIGISGGVTSMD
VFMST1 VTITCVVAAMGG-LIFGYDIGISGGVTSMN
NIMST1 VVTCVVAAMGG-LIFGYDIGISGGVTSMD
HEX6R1 VALSCMAAMGG-VIFGYDIGVSGGVTSMD
RCSTA1 VVACMVAAVGG-SIFGYDIGISGGVISMD
LDOND1 RASVMLCAALGG-FLFGYDTGVINAALFQM
SPITR2 IWVLSAVAGISG-LLFGYDTGVISGALAVL
ITR1YE IITLTFVASISG-FMFGYDTGYISSALISI
ITR2YE IITLTFVASISG-FMFGYDTGYISSALISI
HKT2YE VICLCMLIAFGG-FVFGWDTGTISGFVNQT
GAL2YE VSLLCLCVRFGG-FMFGWDTSTISGFVVQT
GALPEC TFFVCFLAALAG-LLFGLDIGVIAGALPFI
XYLECO IFSITLVATLGG-LLFGYDTAVISGTVESL
RAG1KL VSLCCVMVAFGG-FVFGWDTGTISGFVNQT
LACPKL LYGLCFITYLCA-TMQGYDGALMGSITYTED
QYANEU VYTCAAIASFAS-CMIGYDSAFIGTTLALP
MAL61Y AAAWSLLVSTTL-IQEGYDTAILGAFYALP

TGTP1 a.a. 53 - 106

TGTP1 LNANFLYQVTSVLVICAIAAFAFTCGWVADGLGRKRKSLMVNNGIGIV-GSVISS
 SGTTP1 LDSSFFYTHVSTIFVVAAGAFSCGWVADGLGRRNGLILMNNGIIGI-GGVIVG
 SGTTP4 VTPSFLYAQVSTAFVVAIGAIFSCGAIADCLGRRNGLIVNSLLAII-GGILVG
 TGTP2 -FVQAMSSLVVAGFPFVIGGIFGALFGGSVSNKMGRKLSLFIPIPIPAV-GSLLMM
 SGTTP2 -FIDLLWSLCVTSFLLGGFFGGLIGGVLANKLGRKNSLFLLSIPTVI-GSLLMM
 GLUT1H TTLTTLWSLSVAIFSVGGMIGSFVSVGLFVNRFGRRNSMLMNLAVF-SAVLMG
 GLUT1R TTLTTLWSLSVAIFSVGGMIGSFVSVGLFVNRFGRRNSMLMNLAVF-SAVLMG
 GLUT3H VLLTSLWSLSVAIFSVGGMIGSFVSVGLFVNRFGRRNSMLMNLAVT-GGCFMG
 GLUT3R GLLTTLWSLCVAIFSVGGMIGSFVSVGLFVNRFGRRNSMLMNLAIL-GGCLMG
 GLUT4H GTLTTLWALSVAIFSVGGMISSFLIGIISQWLGRKRAMLVNNVLAFL-GGSLMG
 GLUT4R GTLTTLWALSVAIFSVGGMISSFLIGIISQWLGRKRAMLANNVLAFL-GGALMG
 GLUT2H QLITMLWSLSVSSFAVGGMTASFFGGWLGDTLGRIKAMLVANILSLV-GALLMG
 GLUT2R HIVTMLWSLSVSSFAVGGMVASFFGGWLGDKLGRIKAMLAANSLSLT-GALLMG
 GLUT5H FPLTLLWSVTVMFPFGGFIGSLLVGLPLVNKFGKRGALLFNNIFSIIV-PAILMG
 GLUT5R FPLTLLWSVTVMFPFGGFIGSLLVGLPLVNNLGRKGLLNNVLFIL-PAILMG
 PFHTP1 SNNTIQSSFLLASVFIGAVLGCFCFSYLVQ-FGRRLSLLIYINFFFL-VSILTS
 LDOND2 GYSSIQSGVFAGSLVIGSTMGALMGGYLTKRLDYCKSFLFIGLLSVI-GNVLTH
 LENRPR GYSSSESGIFAGSMIAGCLIGSVFAGPLASKIGARLSFLLVGLVGVV-ASVMYH
 LMXEGL GYSSSESGIFAGSMIAGCLIGSVFAGPLASTIGARLSFLLVGLVGVV-SSVMCH
 TCRUGL GYSSSYNGIFAGSMIVGAMIGSIYAGQFAARFGHKVSLVIGVGVV-SSVMYH
 TBRUHT AYTSVYSGIFACAMIVGSMVGSIIAGKCITTFGLKKSFIIVSITCTI-ACVVVQ
 TCONGL GYDALHSGIFACSMIVGSMIGSIIVTERFITMFLKKSFLVIAIIGVV-ASAMNH
 TVIVGL GYNSLESGLFACSMIVGSMIGSIIFAGKFLSKFGLKMSFIVSGVLGIV-GSALIH
 DMGTP1 EFIQQLYSVAVSIFAI-GMLGGFSGGWMANRFRGRKGLLNNVLFVIA-GACLMG
 HUF1CH TYDNAKLQLFVSSFLLAGLVSCLFASWITRNWGRKVTMGIGGAFFVA-GGLVNA
 HUF2CH TYDQKQLQFTSSFFLAGMVFVFFAGSVVRRWGRKPTMLIASVFLA-GAGLNA
 HUF3CH TYDNPKLQLFVSSFLLAGLISCFISAWITRNWGRKASMGIGGIFFAAGGLVNA
 ATHGL2 RFDSVSLTLFTSSLYLAALCSSLVASYVTRQFGRKISMLLGGVLFCA-GALING
 ATSTP1 QYDSPTLTMFTSSLYLAALISSLVASTVTRKFGRRLSMLFGGILFCA-GALING
 ATSTP4 RFDSQLLTLFTSSLYVAALVSSLFASITITRVFGRKWSMFLGGFTFFI-GSAFNG
 ATSTP3 LFNSQLLTSFTSSLYVSGLIATLLASSVTRSWGRKPSIFLGGVSLA-GAALGG
 RCSTC1 QYDSQTLTMFTSSLYLAALIASLVASTITRKFGRKLSMLFGGVLFCAGAIING
 VFMST1 QYDSETLTLFTSSLYLAALLSSVASTITRRFGRKLSMLFGGLFLV-GALING
 NTMST1 KFDSQTLTMFTSSLYLAALLSSLVASTVTRKLGRRLSMLCGGVLFCAGALING
 HEX6R1 KFDSQLLTSFTSSLYVAGLVASFFASSVTRAFGRKPSILLGGV-FLA--AALGG
 RCSTA1 KYDDQRLAAFTSSLYLAGLAASLVAGPITRIYGRRASIISSGISFLI-GAALNA
 LDOND1 SEHSSQYALIVAIAIAGAFVGAIFSGFISAAFGRRRPCIAVADALFVI-GSVLMG
 SPITR2 VLSSGQKELITSATSFAALISATTSGWLADWVGRKRLLLCADAI FVI-GSVIMA
 ITR1YE VLTYEKEIVTAATSLGALITSIFAGTAADIFGRKRCLMGSNLMFVI-GAILQV
 ITR2YE VLTYEKELITAATSLGALITSVAGTAADVFGRRPCLMFSNLMFLI-GAILQI
 HXT2YE YLSDVRTGLIVSIFNIGCAFGLTLGRLGDMYGRRIGLMCLVLYYIV-GIYIQI
 GAL2YE YLSNVRTGLIVAIFNIGCAFGGIILSKGDMYGRKKSLSIVSVYIV-GIYIQI
 GALPEC QITSHTQEWVSSMMFGAAVAVGSGWLSFKLGRKKSLSMIGAILFVA-GSLFSA
 XYLECO SAANSLLGFCVASALIGCIIGGALGGYCSNRFGRRDSLKIAAVLFFI-SGVGSA
 RAG1KL YLSNVRTGLIVSIFNIGCAVGGIVLSNIGDRWGRRIGLITVYIYVI-GIYIQI
 LACPKL DINSSSGTGLVFSIFNVGQICGAFFVPLMDWKGRKPAIIGCLGVVI-GAIYSS
 QYANEU GALALLQSNIVSVYQAGAFFGCLFAYATSFLGRKKSIIAFSVVFI-GAAIML
 MAL61Y EISVSWQIGLCLCYMAGEIVGLQVTGPSVDYMGNRYTLIMALFFLAA-FIFILY

TGTP1 a.a. 115 - 170

TGTP1 LLYVGRAISGLNSGLSIGIAAMFLTEIAPRHLRGMIGACNQLAIIITIGIVISYVLT
 SGRP1 LLYVGRFVIGINSGITIGIASLYLTEVAPRDLRGGIGACHQLAVTVGIAFSYFITF
 SGRP4 LLFVGRVFNFGNFGISMGIAFMYLTEIAPLSLRGGIGSLHQLALITIGILVSYLMTL
 TGTP2 MIIVGRVVLVGFACGAFPTGIAPVYLAEIAPVRIIRGMSGIMHQLAIVCAILISQILGL
 SGRP2 MLIIGRFITIGIACGAHTVVGEMFLSEIAPVNFRAAGTFNFQFVIVSAILLSQVLSL
 GLUT1H MLILGRFIIGVYCGLTTFGVPMYVGEVSPAFRGALGTLHLQLGIVVGIILIAQVFG
 GLUT1R MLILGRFIIGVYCGLTTFGVPMYVGEVSPALRGALGTLHLQLGIVVGIILIAQVFG
 GLUT3H MLILGRVLVIGLFCGLCTGFVPMYIGEISPTALRGAFGTLNQLGIVVGIILVAQIFGL
 GLUT3R MLILGRLLIIGIFCGLCTGFVPMYIGEVSPTALRGAFGTLNQLGIVVGIILVAQVFG
 GLUT4H MLILGRFLIGAYSGLTSGLVPMYVGEIAPTHLRGALGTLNQLAIVIGILIAQVGL
 GLUT4R LLILGRFLIGAYSGLTSGLVPMYVGEIAPTHLRGALGTLNQLAIVIGILVAQVGL
 GLUT2H LIIAGRSISGLYCGLSISGLVPMYIGEIAPTALRGALGTFHQLAIVTGILISQIIGL
 GLUT2R LIIAGRSVSGLYCGLSISGLVPMYIGEIAPTALRGALGTLHLQLAVTGILISQIAGL
 GLUT5H LIIISRLVVGICAGVSSNVPMYLGELAPKNLRGALGVVQQLFITVVGILVAQIFGL
 GLUT5R LIIIASRLLVIGCAGISSNVPMYLGELAPKNLRGALGVVQQLFITVVGILVAQIFGL
 PFHTP1 TTLFARLLSGFGLVTVSVPMYISEMTHKDKKGGAYGVMHQLFITVFGIFVAVMLGL
 LDOND2 VLFVARIVLGFPLGWQSITSSHYTDKFPAPANHAKTLGTLFQVSVSTGIFVTSFFGL
 LENRPR VLIIVGRFVIGLFLGVICVACPVYTDQNAHPKWKRTIGVMPQVFTTLGIFVAALMGL
 LMXEGL VLVVGRFVIGLFLVGVIGVACPVYTDQNAHPKWKRTIGVMPQVFTTLGIFIAAAVGL
 TCRUGL LVCVGRLLIGVNLVACPMYVDQNAHPKFLHVDGVLFQVFTTFGIMFAAMGL
 TBRUHT ALCTGRVVLIGLVGILCSVCPMYVNENAHPKLCKMDGVLFQVFTTLGIMLAAMLGL
 TCONGL VLCPARLLMGLGLGILCSVCPMYVNENAHSKHRKVDGVMPQVFTTFGIMLAALLGL
 TVIVGL VMCVGRFLMGLVGLVLCVASPMYVNENAHPKYRKTIGVLFQVFTTFGIMFAALLGL
 DMGTP1 MLFLGRFIIGVNCGLTSLVPMYISEIAPLNLRGGIGTVNQLAVTVGLLSQVLI
 HUP1CH MLIVGRVLLGFGVGLGSQVVPQYLSVAPFVSHRGMNLICYQLFVTIGILIAGLVNY
 HUP2CH MLVIGRVLGFGVGGNNVPLYLSECAFPKYRGGNMMFQLAVTIGIIVAQVNY
 HUP3CH MLIVGRVLLGFGVGLGSQVVPQYLSVAPFVSHRGMNLICYQLFVTIGILIAGLVNY
 ATHGL2 MLIVGRLLGFGIGFTNQSVPLYLSEMAPYKYRGALNIGFQLSITIGILVANLNF
 ATSTP1 MLIVGRILLGFGIGFANQAVPLYLSEMAPYKYRGALNIGFQLSITIGILVAEVLNY
 ATSTP4 MLLIGRILLGFGVGFANQSVPLYLSEMAPPNLRGAFNNGFQVAIIFGIVVATIINY
 ATSTP3 MLIARLLGLGVGFANQSVPLYLSEMAPAKYRGAINNGFQLCIGIGFLSANVINY
 RCSTC1 MLILGRILLGFGIGFANQSVPLYLSEMAPYKYRGALNIGFQLSITIGILVANLNY
 VFMST1 MLIVGRILLGFGIGFANQSVPLYLSEMAPYKYRGALNIGFQLSITIGILVANLNY
 NTMST1 MLIVGRILLGFGIGFANQSVPLYLSEMAPYKYRGALNIGFQLSITIGILVANLNY
 HEX6R1 MLIIFGRVLLGFGVGFANQAVPLYLSEMAPPRYRGAINNGFQFSVIGALSANLNY
 RCSTA1 MLLGRIMLGVGIGFNGQAVPLYLSEMAPTHLRGGGLNIMFQLATTSGIPTANMNY
 LDOND1 VLLVSRVIVGIAIGISSATIPVYLAEVTSPKHRGATIVLNNLFTGGQFVAAGFTA
 SPITR2 MMVVGRFIVGYGIGLTSLIVPMYITELAPARLRGRLLVIIVVFTGGQLIAYSINA
 ITR1YE QMAVGRLLIMGFGVIGSLIAPLFISEIAPKMIRGRLLTVINSLWLTGGQLVAYGCGA
 ITR2YE QMAAGRLIMGFGVIGSLISPLFISEIAPKMIRGRLLTVINSLWLTGGQLIAYGCGA
 HXT2YE QYFIGRIISGLGVGGIAVLSPTLISEIAPKHIRGTCSVFCQLMFTGIFLGYCTNY
 GAL2YE QYFIGRIISGLGVGGIAVLCPLMISEIAPKHLRGTLVSCYQLMFTAGIFLGYCTNY
 GALPEC VLLLSRVLLGLAVGVASYPAPLYLSEIAPKHIRGTCSVFCQLMFTGIFLGYCTNY
 XYLECO EFVIYRIIGGIGVGLASMLSPMYIAELAPAHIRGKLVSNFQFAIFGQLLVYCVNY
 RAG1KL QYFIGRIISGLGVGGITVLSPLMISEIAPKHLRGTLVSCYQLMFTGIFLGYCTNY
 LACPPL ALIGGRVWFVAFATIANAAPTYCAEVAPAHLRGKLVAGLYNTLWSVGSIVAAPSTY
 QYANEU PIIAGRVLAGVGGASNMVPIYISELAPPAVRGRLLVGIYELGWQIGGLVGFVINY
 MAL61Y MIAVGQALCGMPWGCFCQCLTVSYASEICPLALRYLTYTNSLNCWTFGQLFAAGIMK

TGTP1 a.a. 179 - 216

TGTP1 LWPVAMGVGAIPAVIALIISPFT---VESPRWLYLKKKDE
 SGTPT1 LWPLAVALGAVPAAISLVTLPPFC---PESPRFLYMKKHKE
 SGTPT4 LWPISVAVGVSVPALIALILLPYC---PESPRFLFIKKGKE
 TGTP2 LWPYLLGLTIIPSVLLFLFWIC---PDSPRYILLNSQDL
 SGTPT2 LWPYLLALCTVSSVIHILLLFTC---PESPTYLYI IKGDR
 GLUT1H LWPLLLSIIFIPALLQCIVLPPFC---PESPRFLLINRNEE
 GLUT1R LWPLLLSVIFIPALLQCIVLPPFC---PESPRFLLINRNEE
 GLUT3H LWPLLLGFITLPAIQSAALPFC---PESPRFLLINRKEE
 GLUT3R LWPGLLGLTIIPAILQSAALPFC---PESPRFLLINRKEE
 GLUT4H LWPLLLGLTVLPALLQVLVLPFC---PESPRYLYIQNLE
 GLUT4R LWPLLLAITVLPALLQLLLLPFC---PESPRYLYIIRNLE
 GLUT2H LWHILLGLSGVRAIQSLLLPFC---PESPRYLYIKLDEE
 GLUT2R YWHILLGLSAVPALLQCLLLPFC---PESPRYLYLNLEE
 GLUT5H GWPILLGLTGVPAAQLLLLLPFP---PESPRYLLIQKKDE
 GLUT5R GWPILLGLTGVPAGLQLLLLLPFP---PESPRYLLIQKKNE
 PFHTP1 LWWRMLFELFSPVISLIGILALVVFPKEETPYFLPEKGRIE
 LDOND2 MQGLVSVSTLLSIFVVFLPLITKDGYSKSRRGDVEGENSE
 LEMRPR MQGLCVFSTLFSLLTVVLGIVTR---ESRAKFDGG--EE
 LMEXGL MQGLCAFSTLFSLLTILLGIVMS---ESRAKFGDD--EE
 TCRUGL MQGYCAFSTLLSVMVALGIFLG---ESKTKFTSGKHED
 TBRUHT LHVFSAVPLGLSVAMFLVGMFLR---ESTATFAQDDDGK
 TCONGL LHGFCAVSSILAVVMFIMGIFLR---ESKTVVVCENAGK
 TVIVGL MQVFCVSTALSALLVVLGIVVR---KSKTSFAGGVDSA
 DMGTP1 GWPILLGLAICPAIQLLLPVC---PESPRYLLITKQWE
 HUP1CH GWRLSLGPAAAPGAILFLGSLVL---PESPNFLVEKKGKTE
 HUP2CH GWRLSLGLAGVPAIILLIGSLLL---PETPNSLIERGHRR
 HUP3CH GWRLSLGLAAVPLGILLLGLAIVL---PESPNFLVEKGRTD
 ATHGL2 GWRLSLGGAVVPALIIITVGSLLI---PDTPNSMIERGQFR
 ATSTP1 GWRLSLGGAVVPALIIITIGSLVL---PDTPNSMIERGQHE
 ATSTP4 GWRISLGLACVPAVMIMIGALIL---PDTPNSLIERGYTE
 ATSTP3 GWRISLATAAIPASILTGLSLFL---PETPNSIIQTTGDV
 RCSTC1 GWRLSLGGAMVPALIIITVGSLLI---PDTPNSMIERGQHE
 VFMST1 GWRLSLGGAMVPALIIITIGSLIL---PDTPNSMIERGDRD
 NTMST1 GWRLSLGGAMVPALIIITIGSLFL---PETPNSMIERGNHD
 HEX6R1 GWRISLAMAAPPAIITFGALFL---PETPNSLIQRSNDH
 RCSTA1 GWRLSLGLAAPALLMTIGLLL---PETPNSLIEQGLHE
 LDOND1 GWRVAIGIGALPAVVQAFCLLFFL---PESPRWLLSKGHAD
 SPITR2 GWRIMFGIGAAPALGQLISLFWT---PESPRYLRLRHNVHE
 ITR1YE GWRILVGLSLIPTAVQFTCLCFL---PDTPRYVVMKGDLA
 ITR2YE GWRILVGLSLIPTVLQFSFFCFL---PDTPRYVVMKGDLK
 HXT2YE QWRVPLGLNFAPAIFMIAGMLMV---PESPRFLVEKGRYE
 GAL2YE QWRVPLGLCFAWSLFMIGALTLV---PESPRYLCEVNVKE
 GALPEC AWRWMLGVIIIPAILLLIGVFFL---PDSPRWFAAKRRFV
 XYLECO GWRYMFASECIPALLFLMLLYTV---PESFRWLMSRGKQE
 RAG1KL QWRVPLGLCFAWAIFMVLGMMFV---PESARFLVETDQIE
 LACPFL AFKIPLYLQMMFPGLVCIFGWLII---PESPRWLVGVGREE
 QYANEU QWLIFFAVQLIPAGLLFLGSEFWI---PESPRWLYANGKRE
 MAL61Y GYKLPFALQWIWPLPLAVGIFLA---PESFWWLVKKGRID

TGTP1 a.a. 262 - 297

TGTP1 LRMPVIAVLIQVMQQLSGINAVVANSSEMLKSAKV
 SGTP1 LRMPVLIACLIQVLQQLSGINAVITYSSLMLELAGI
 SGTP4 LRMPVLIACIQVFQQLSGINAVITYSSTMLKTAGI
 TGTP2 LRLALFVAVVAHLAQQFSGINAALFYSTSLFESIGL
 SGTP2 LRWGLIVALVPHIGQQFSGINGILYYFVSLFISNGL
 GLUT1H YRQPILIAVVLQLSQQLSGINAVFYYSTSIFEKAGV
 GLUT1R YRQPILIAVVLQLSQQLSGINAVFYYSTSIFBKAGV
 GLUT3H YRQPIIISIVLQLSQQLSGINAVFYYSTGIFKDAGV
 GLUT3R YFQPLLIISVVLQLSQQLSGINAVFYYSTGIFQDAGV
 GLUT4H HRQPLIIAVVLQLSQQLSGINAVFYYSTSIFETAGV
 GLUT4R HRQPLIIAVVLQLSQQLSGINAVFYYSTSIFELAGV
 GLUT2H YRQPILVALMLHVAQQFSGINGIFYYSTSI FQTAGI
 GLUT2R YRQPIVVALMLHLAQQFSGINGIFYYSTSI FQTAGI
 GLUT5H LRWQLLSIIIVLMGGQQLSGVNAIYYYADQIYLSAGV
 GLUT5R LRWQLLISTIVLMTGQQLSGVNAIYYYADQIYLSAGV
 PFHTP1 YRYVILGCLLSGLQQFTGINVLSNSNELYKEFLD
 LDOND2 MIGPILNGVAMGCVTQLTGINANMNFAPTIMSNLGL
 LENRPR MIPRLLMGCVMAGTLQLTGINAVMNYAPTIMGSLGL
 LMEXGL MVRPRLMGAVMAGTLQLTGINAVMNYAPAIMGSLGL
 TCRUGL MLGPLAMGLVTSGLQLTGINAVMNYAPKIMGNLGM
 TBRUHT MLWPLFMGAVTAGTLQLTGINAVMNYAPKITENLGM
 TCONGL MMWPLFMGMTAGTLQLTGINAVMNYAPKITENLGM
 TVIVGL MLGPLAVGAVTAGTLQLTGINAVMNYAPEIMRNIGM
 DMGTP1 LRPPLIIGIVMQLSQQFSGINAVFYYSTSLFMSSGL
 HUP1CH YMPQLLTSFVIQFFQQTGINAIFYVPVLFSSLSGS
 HUP2CH YSPMLIVTSLIAMLQQLTGINAIMFYVPVLFSSFGT
 HUP3CH YMPQLLTSFVIQFFQQTGINAIFYVPVLFSSLSGS
 ATHGL2 YRPHLTMAILIPAFQQLTGINVIMFYAPVLFQTIGF
 ATSTP1 YRPHLTMAVMIPFFQQLTGINVIMFYAPVLFNTIGF
 ATSTP4 YRPQLIMTCFIPFFQQLTGINVITFYAPVLFQTLGF
 ATSTP3 YRPELVMALVIPFFQQTGINVVAFYAPVLYRTVGF
 RCSTC1 YRPHLSMAIAPFFQQLTGINVIMFYAPVLFDTIGF
 VFMST1 YRPQLTMAVLIPFFQQTGINVIMFYAPVLFNSIGF
 NTMST1 YRPHLTMAIMIPFFQQLTGINVIMFYAPVLFKTIGF
 HEX6RI YRPQLVMAVAIPFFQQTGINVIAFYAPILFRTIGL
 RCSTA1 NRPQLVMAIFMPTFQILTGINIILFYAPPLFQSMGF
 LDOND1 MRFRVVLSSGLQIIQQFSGINTIMYSSVILYDAGF
 SPITR2 NRRSLFIGCFLQWFQFSGTNAIQYFSAIIFQSVGF
 ITR1YE NLRALIIGCGLQAIQQFTGWNSLMYFSGTIFETVGF
 ITR2YE NFRALIIGCGLQAIQQFTGWNSLMYFSGTIFETVGF
 HXT2YE ILPRVIMGIMIQSLQQLTGNNYFFYYGTTIFNAVGM
 GAL2YE VFQRLLMGVFVQMFQQLTGNNYFFYYGTVIFKSVGL
 GALPEC FRRRAVFLGVLQVMQQTGMNVIMYYAPKIFELAGY
 XYLECO GVGVIIVIGVMLSIFQFQFVGINVVLYAPEVFKTLGA
 RAG1KL MFRRTLGMGIMIQSLQQLTGDNYFFYYGTTIFQSVGM
 LACPKL DRYRAMLVILMAWFGQFSGNNVCSYLLPTMLRNVGM
 QYANEU VQWRFFLGGMLFFWQNGSGINAINNYSPTVFRSIGI
 MAL61Y INRRRTRIACLCWIGQCSCGASLIGYSTFYFEKAGV

TGTP1 a.a. 303 - 353

TGTP1 EYFVVGLGLLNVICTIVALPILLEKAGRRTLLLWPSLVVAI ILLLLVIFVNI
 SGTp1 QYCVFAIGVLNVIVTVVSLPLIERAGRRTLLLWPTVSLALSLLLLLTFVNL
 SGTp4 QFCVVAVPAINVLMTVLSVYLIERAGRRTLLLWPTVLLAFSLLCLTISVNI
 TGTP2 VYATLGVGSMIVVITVASIFLIERVGRRI LLIGGLSVMLFSAVITIGLAL
 SGTp2 SYANLGTGVTILIGAFASIFVIDRKGRRP LLMFGTSVCLFSLLLFTLTLII
 GLUT1H VYATIGSGIVNTAFTVVS L FVVERAGRRTLHLI GLAGMAGCAILMTIALAL
 GLUT1R VYATIGSGIVNTAFTVVS L FVVERAGRRTLHLI GLAGMAGCAVLMTIALAL
 GLUT3H IYATIGAGVNTI FTVVS L F LVERAGRRTLHMI GLGGMFCSTLMTVSSLL
 GLUT3R IYATIGAGVNTI FTVVS L F LVERAGRRTLHMI GLGGMVAVCSVPMTISLL
 GLUT4H AYATIGAGVNTVFTLVS V L LVERAGRRTLHL LGLAGMCGCAILMTVALL
 GLUT4R AYATIGAGVNTVFTLVS V L LVERAGRRTLHL LGLAGMCGCAILMTVALL
 GLUT2H VYATIGVAVNMVFTAVSV L VEKAGRRS L FLIGMSGMFVCAIFMSVGLVL
 GLUT2R VYATIGVGA INMI FTAVSV L LVEKAGRR TFLAGMIGMFCVAVFMSLGLVL
 GLUT5H QYVTAGTGAVNVMTFC AVFVVELLGRRL LLLGFSICLIACCVLTAALAL
 GLUT5R QYVTAGTGAVNVMTVMVTFV VVELWGRRN LLLIGFSTCLCTACTIVLVALAL
 PFHTp1 TILSVVMTAVNFM LMTFPAIY IVEKLG RKTLL LWGCVGLVAYPTAIA NEIN
 LDOND2 LVGNI IVMAWNMLATFCV IPLSRR FSRMRTLFLFCG FVGS LCCVFLGGIPVY
 LENRPL LVGNFVVM LWNFV T T L A S I P L S Y V F T M R H V F L F G S I F T S C M C L F M C G I P V Y
 LMEKGL LVGNFVVM LWNFV T T L A S I P L S Y V F T M R Q L F L F G S L F T S S M C L F M C G I P V Y
 TCRUGL LVGNFVVM AWNFV T T L V S I P L A R V L T M R Q L F L G A S L V A S V S C L L L C G V P V Y
 TBRUHT SLGNFLVM AWNFV T S L V A I P L A S R F T M R Q M F I T C S F V A S C M C L F L C G I P V F
 TCONGL PLGNFLVM MWNFV T A L V A I P L A S R F T M R Q M F I T C S F I A S C T C L F L C G I P V F
 TVIVGL MEGNSAVMS WNFV T A L V A I P L V S R F T M R Q L P L A C S F M A S C A C L I M C G I P V Y
 DMGTP1 KFATIGIGAIMVMTLVS I P L M D R T G R R T L H L Y G L G G M F I F S I F I T I S F L I
 HUP1CH LLNTVVVGAVNVG S T L I A V M F S D K F G R R F L L I E G G I Q C C L A M L T T G V V L A I
 HUP2CH LLNTV I I G A V N V A A T F V S I F S V D K F G R R G L F L E G G I Q M F I G V V T A A V L G V
 HUP3CH LLNTVVVGAVNVG S T M I A V L L S D K F G R R F L L I E G G I T C C L A M L A A G I T L G V
 ATHGL2 LISAVVTGLVNVGATVVS IYGVDKWGR RFLFLEGGFQMLISQVAVAAAIGA
 ATSTP1 LMSAVVTGSVNVGATLVS IYGVDRWGR RFLFLEGGTQMLICQAVVAACIGA
 ATSTP4 LLSAMVTG I I E L L C T F V S V F T V D R F G R R I L F L Q G G I Q M L V S Q I A I G A M I G V
 ATSTP3 LMSTLVTVIGTSS T L L S M L V D R I G R K T L F L I G G L Q M L S Q V T I G I V M V
 RCSTC1 LMSAVITGLVNVFATMVS IYGVDKWGR RFLFLEGGVQMLICQAVVAACIGA
 VFMST1 LMSAVITGVNVVATCVS IYGVDKWGR RALFLEGGVQMLICQAVAVSIAA
 NTMST1 LMSAVITGVNVLATVVS IYVVDKLG RRRFLFLEGGI QMLICQIAVVSICIAI
 HEX6R1 LLSSIVTGLVGSASTFISMLIVDKLG RRALFIFGGVQMFVAQIMVGSIMAA
 RCSTA1 LYSSAVTGAVLCSSTFIS IATVDR LGRRFLLISGGIQMITCQVIVAIILGV
 LDOND1 VVLSIPLAFMNALFTAVA IFTVDRFGR RRM L L I S V F G C L V L L V V I A I I G F F
 SPITR2 ISVSIVVGATNFVFTI VAFMFIDRIGRRRI L L C T S A V M I A G L A L C A I A Y H F
 ITR1YE SAVSIVSGTNFI FTLVAFFSIDKIG RRTI L L I G L P G M T A L V V C S I A F H F
 ITR2YE SAVSIVSGTNFVFTLIA IAFPCIDKIG RRYI L L I G L P G M T A L V V C S I A F H F
 HXT2YE FQTSIVLGI VNFAS T F V A L Y T V D K F G R R K C L L G G S A S M A I C F V I F S T V G V T
 GAL2YE FETSIVIGVNVFAST F F S L W T V E N L G R R K C L L G A A T M M A C M V I Y A S V G V T
 GALPECO MWGTVIVGLTNV L A T F I A I G L V D R W G R K P T L T I G F L V M A A G M G V L G T M M H I
 XYLBE0 LLQTIIVGVINLFTVLA I M T V D K F G R K P L Q I I G A L G M A I G M F S I G T A F Y T
 RAG1KL FETSIVLGI VNFAS T F F A L Y T V D H F G R R N C L L Y G C V G M V A C Y V V Y A S V G V T
 LACPKL VLMNGVYSIVTWISSICG A F F I D K I G R R E G L F G S I S G A A L A L T G L S I C T A R
 QYANEU LTTGIFGVVKMVLTI I W L L W L V D L V G R R R I L F I G A A G G S L C M W F I G A Y I K I
 MAL61Y FTFSIQYCLGIAATFVSWWASKYCGRFDLYAFGLAFQAIMEFFIIGGLGCS

TGTP1 a.a. 368 - 417

TGTP1 VSAVLVFIYVAAPFAMGLGMPALIVAEIFRQGPRAAAAYSLSQSI-QWACNL
 SGT1P1 ISIILLILIYCSFALGLGVPALIVSEIFRQGPRAAAAYSLSQSI-QWLSNL
 SGT1P4 ISAVLIILYICGFALGLGPIPGVIVAEIFRQEPRAAAAYSLSQGV-NLLCNL
 TGTP2 LAITFVYIFVGGFAIGPGSIPWFVVAEMFVQETRDPAIVITVIV-NWLAQI
 SGT1P2 LSIVLTYTFLFGFSV---SIPWFLVSEFLTQENRDAAVSIAAAT-NWLCNA
 GLUT1H LSIVAI FGFVAFPEVGPPIPWFI VAE LFSQGPRAAIAVAGFS-NWTSNF
 GLUT1R LSIVAI FGFVAFPEVGPPIPWFI VAE LFSQGPRAAIAVAGFS-NWTSNF
 GLUT3H VCIGAILV FVAFPEIGPGPIPWFI VAE LFSQGPRAAMAVAGCS-NWTSNF
 GLUT3R VCIVAILV VVAFPEIGPGPIPWFI VAE LFSQGPRAAMAVAGCS-NWTSNF
 GLUT4H VSIVAI FGFVAFPEIGPGPIPWFI VAE LFSQGPRAAMAVAGFS-NWTSNF
 GLUT4R VSIVAI FGFVAFPEIGPGPIPWFI VAE LFSQGPRAAMAVAGFS-NWTCNF
 GLUT2H VSMIAI FLVSVFFEIGPGPIPWFMVAE FFSQGPRAALAI AAFS-NWTCNF
 GLUT2R VSMTAI FLVSVFFEIGPGPIPWFMVAE FFSQGPRTALALAAFS-NWVCNF
 GLUT5H ISIVCVISYVIGHALGPPIPALLITEIFLQSSRPSAFMVGGSV-HWLSNF
 GLUT5R VSIVCVIVVIGHAVGPPIPALFITEIFLQSSRPSAYMIGGSV-NWLSNF
 PFRTP1 LSIVATFVMIISFAVSYGPEVLWYI LHEMFPSSEIKDSAASLASLV-NWVCAI
 LDOND2 IAITGIAIFIALYEMGVGPCFYVLAVDVFPESFRPIGSSITVGV-MFIFNL
 LENRPR VAITGILLFILGFVFCVYVLTQDMFPSPFRPRGASFTQVA-QFIFNL
 LME1G1 VAITGILLFILGFVFCVYVLTQDMFPLSFRPRGASFTQVA-QFIFNL
 TCRUGL VAITGIAVFI AAFEIGLGP CFFVLAQELFPRSFRPRGSSFVLLT-NFIFNV
 TBRUHT VATTGIALFIAAFEFVGVSCFFVLAQDLFPPSFRPKGGSFVVM-MQIFNI
 TCONGL VATTGIALFIAAFEFVGVSCFFVLAQDLFPPSFRPKGASFVVM-QFVPMI
 TVIVGL VATVGI AVFIAAFEFVGVSCFFVLAQDLFPRSFRPTGSSFVMA-QFIFNI
 DMGTP1 LSVVATLGFV VVFAVGP GSI PWMITAAVFSQGP RPSAMAI AVL NWMANF
 HUP1CH GILAVICIFISGFAWSWGP MGLIPSEIF TLETRPAGTAVAVG-NFLFSF
 HUP2CH GVLVVICVYVAAF AFSWGP LGLWLPSEIF TLETRGAGMSMAVIM-NFLFSF
 HUP3CH GVLVVICIFISGFAWSWGP MGLIPSEIF TLETRPAGTAVAVG-NFLFSF
 ATHGL2 VVVLFCIYVAAF AFSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAAQSI TVSV-NMIFTF
 ATSTP1 VVVFIC IYVAGFAWSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAAQSI TVSV-NMIFTF
 ATSTP4 LIVALI C IYVAGFAWSWGP LGLWLPSEI SPLEIRSAQA INVSV-NMFPTF
 ATSTP3 AVVVLV CVYVAGFGWSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAQSVTVAV-SFVPTF
 RCSTC1 VVVLFC IYVSGFAWSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAQSVNVSV-NMFPTF
 VFMST1 VVVLFC IYVAGFAWSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAAQSVNVSV-NMLFTF
 NTMST1 VVVFIC IYVAGFAWSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAAQSI TVSV-NMIFTF
 HEX6R1 IVLILIC IYVAGFGWSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAQSI TVAV-SFLPTF
 RCSTA1 VVVMIC IYVLAFGWSWGP LGLWLPSEIF PLEIRSAQSI TVAV-NLFPTF
 LDOND1 LFLALLAVFLALYAPGIGCIPWVIMGEIFP THLR TSAASVATMA-NWGANV
 SP1TR2 VVLASIIIFLASYASGIGNIPW-QQAE LFPMEVRLGAGFSTAI-NWVGNL
 ITR1YE VIIIVFIIVFAAFYALGIGTVPW-QQSE LFPQNVRGIGTSYATAT-NWAGSL
 ITR2YE VIIIVFIIVYAAFYALGIGTVPW-QQSE LFPQNVRGVGTSYATAT-NWAGSL
 HXT2YE VMIVFTCLFIFFFAISWAPIAYVIVAESYPLRVKNRAMAIAVGA-NWIWGF
 GAL2YE CMIVFTCFYIFCYATTWAPVAVVITAESFPLRVKXCMALASAS-NWVWGF
 GALPECO FAIAMLMLFIVGFAM SAGPLI WVLCSEIQPLKGRDFGICTSTAT-NWIANM
 XYLECO VALLSMLFYVAAFAMS WGPVWLLSEIFPNAIRGKALAI AAVAA-QWLANY
 RAG1KL CMIVFACFYIFCATTWAPIAYVVISSEYPLRVKGMAMIASAS-NWIWGF
 LACPKL GALVPIYLPGGIFSPAF TFMQSMYSTEVSTNLTRSKAQLLNFVV-SGVAQF
 QYANEU AAIFFFYLTAFYTPSWNGTPWVINSEMFQNTNRS LQASAAAN-NWFMNF
 MAL61Y GSGALLMVVAF FYNLGIAPVVFCLVSEMPSSRLRKTITILARNAYNVIQVV

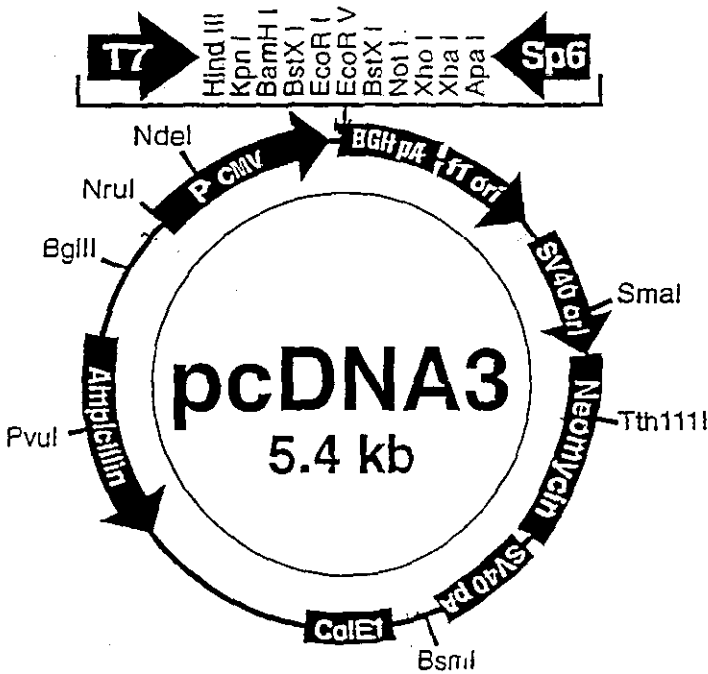
TGTP1 a.a. 418 - 464

TGTP1 IVVASFPSLNELLK-----GYVYLPYLVVVAVCWVFFLFMPETKNRTFDEV
 SGTP1 IVLCSYPVIOKNIG-----GYSFLPFLVVVVICWIFFLFMPETKNRTFDEV
 SGTP4 LVLFSYPSINDAIG-----GYSFLPFLVIVVICWIFFFLYMIETKNRTCDNSN
 TGTP2 VISLGYPLLKYLK-----DYSFMPFIFGLLVIFIALLYFLPETKGRAPCDV
 SGTP2 IVALIFPQLVIYIG-----IYAFIFPICALLVVLIFVGLYLPETKGTTPASI
 GLUT1H IVGMCFOYVEQLCG-----PYVFIIFTVLLVLFIFTYFKVPETKGRTFDEI
 GLUT1R IVGMCFOYVEQLCG-----PYVFIIFTVLLVLFIFTYFKVPETKGRTFDEI
 GLUT3H LVGLLFPSSAAHYLG-----AYVFIIFTGFLITFLAFTFFKVPETGRGTFEDI
 GLUT3R LVGMFFPSAAAYLG-----AYVFIIFAAPLVFFLIFTSFKVPETKGRTFEDI
 GLUT4H IIGMGFOYVAEAMG-----PYVFLLEFAVLLLGGFFIFTFLRVPETGRGTFDQI
 GLUT4R IVGMGFOYVADAMG-----PYVFLLEFAVLLLGGFFIFTFLRVPETGRGTFDQI
 GLUT2H IVALCFQYIADFCG-----PYVFFLFAGVLLAFTLFTFFKVPETKKGKSFEEI
 GLUT2R IIALCFQYIADFLG-----PYVFFLFAGVLLVFTLFTFFKVPETKKGKSFDEI
 GLUT5H TVGLIFPFIQEGLG-----PYSFIVFAVICLLTTIYIFLIVPETKAKFTFIEI
 GLUT5R IVGLIFPFIQVGLG-----PYSFIIFAIICLLTTSIYIFMVPETKGRTFVEI
 PFHTP1 IWFPSDIIKKSPS-----SILFIVFMSMILTFFFI-FFFIKETKGGEGIGTS
 LDOND2 IINICYPIATEGISGGPSGNPNKGQAVAFIFPGCIGVAVCIEYFFLQPVWVEPAKMT
 LENRPR IINVCYPIATESISGGPSGNQDKGQAVAFIFFGGLGLICFVIQVFFLHPWDEERDGGK
 LMXGL IINVCYPIATEHISGGPSGNQDKGQAVAFIFPGCVGMICFIIQVFLRVPETGRDGRDGGK
 TCRUGL IINVCYPIATEGISGGPSGNQDKGQAVAFIFPGCIGLVCFVLQVFFLYPWEESTPQNH
 TBRUHT LINLLYPIITTEAISGGPTANQDKGQAVAFILFGLIGLICSVLQFFYLYPYDANQDHEN
 TCONGL LVNLLYPIITTEAISGGASGNQDKGQAVSFILFGLIGLVCFVLQYFFLYPYEARSSGSDS
 TVIVGL MINLLYPIITVEAISGGKGSPEKQSVSFIIFGIIGICFVLQRLYLPWEDQGGTST
 DMGTP1 VIGIIPFSPMKTALH-----NYTFLPFSVFLAIFWIIQTYKVPETKKNRTFDEI
 HUP1CH VIGQAFVSMCLCAME-----YGVFLFFAGWLVIMVLCALFLLPETKGVPIERV
 HUP2CH VIGQAFVSMCLCAME-----YGVFLFFAGWLVIMVLCALFLLPETKGVPIERV
 HUP3CH VIGQAFVSMCLCAME-----YGVFLFFAGWLVIMVLCALFLLPETKGVPIERV
 ATHGL2 LIAQVFLTMLCHLK-----FGLFIFFAFFVVMVMSIFVYFLPETKGVPIEEM
 ATSTP1 IIAQIFLTMMLCHLK-----FGLFVFAFFVVMVMSIFVYFLPETKGVPIEEM
 ATSTP4 LVAQFLTMLCHMK-----FGLFFFFAFFVVMVMTIYIYMLPETKKNVPIEEM
 ATSTP3 AVAQSAAPPMLCKFR-----AGIFFFYGGWLVVMTVAVQLFLPETKKNVPIEKV
 RCSTC1 VVAQVFLIMLCHLK-----FGLFIFFAFFVVMVMSIFVYFLPETKGVPIEEM
 VFMST1 LVAQIFLTMMLCHMK-----FGLFVFAFFVVMVMTIYIYMLPETKGVPIEEM
 NFMST1 IVAQVFLTMLCHLK-----FGLFVFAFFVVMVMTIYIYFLPETKKNVPIEEM
 HEX6RI VVAQTFLSMLCHFK-----SGIFFFFGGWVVMVMTAFVHFLLPETKKNVPIEKM
 RCSTA1 VIAQSFPSLLCAFK-----FGIFLFFAGWVVMVMTAFVYIFLPLPETKGVPIEEM
 LDOND1 LVSQVFPILMGAIGV-----GGTFTIISGLMALGCIFVYFFAVETKGLTLEEQI
 SPITR2 IISASFLTMMESITP-----TGTFALFAGFCFVGLVTSYFTYPELAGNSIENI
 ITR1YE VIASTFLTMLQNITP-----AGTFAPFAGLSCLSTIFCYFCYPELSGLELEEV
 ITR2YE VIASTFLTMLQNITP-----TGTFSPFAGVACLSTIFCYFCYPELSGLELEEV
 HXT2YE LIGFFTPPITSAGI-----FSYGVVFMGCLVFSFFVYFFVCETKGLTLEEV
 GAL2YE LIAFFTPPITSAIN-----FYYGVVFMGCLVAMFFVYFFVFPETKGLSLEEI
 GALPEC IVGATFLTMLNTLGN-----ANTFWVYAAALNVLFIILLTLWLVPETKHVLSLEHI
 XYLECO FVSWTFPMMDKNSWLVAFHFN---GFSYWIYGCMMVLAALFMWKVFPETKGRTLEEL
 RAG1KL LIGFFTPPITSALH-----FYYGVVFMGCMVFAFFVYFFVFPETKGLTLEEV
 LACPKL VNQFATPKAMKNIK-----YWFYVYVFFDIFEFIVYFFFVETKGRSLEEL
 QYANEU IISRFTPMQFIKME-----YGVYFFASLMLLSIVFIYFFLPVTKSIPLEAM
 MAL61Y VTVLMIMYQLNSEKWNWG-----AKSGFFWGGFCLATLAWAVVDLPETAGRTFIEI

Comments for pcDNA3
5446 nucleotides



CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neo^RORF: bases 2151-2932
SV40 poly A: bases 2933-3128
pUC19 backbone: bases 3272-5446
Amp^r ORF: bases 4450-5310



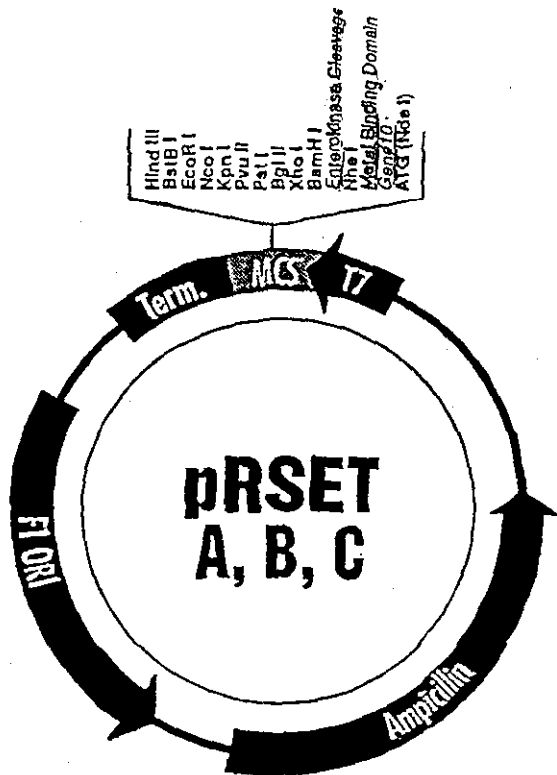
v1.0-130225sa

For Technical Service Call
1-800-955-6288

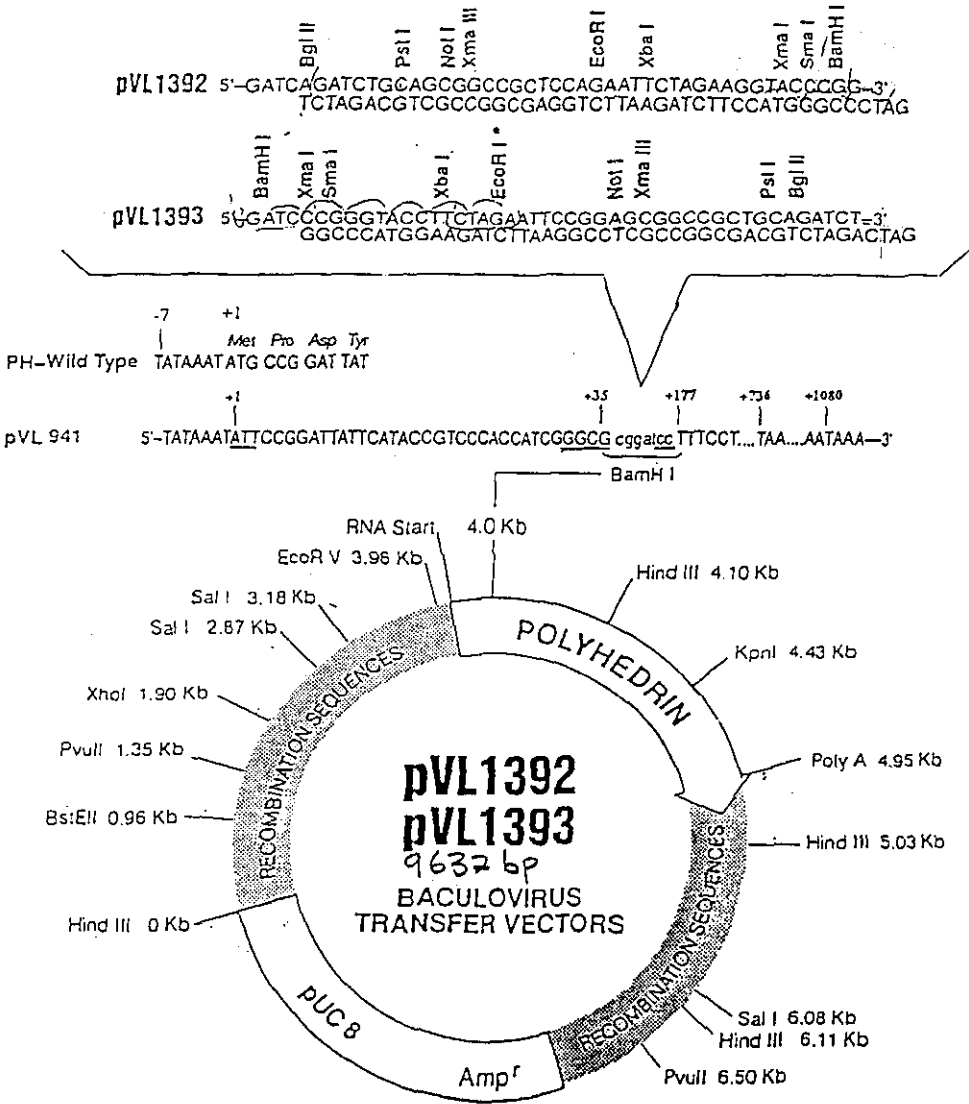
DNA Length: 2999 nucleotides
 First nucleotide: +1
 Date Created: 5/29/1991 (14h:1m:14s)
 Last modified: 5/29/1991 (15h:13m:0s)



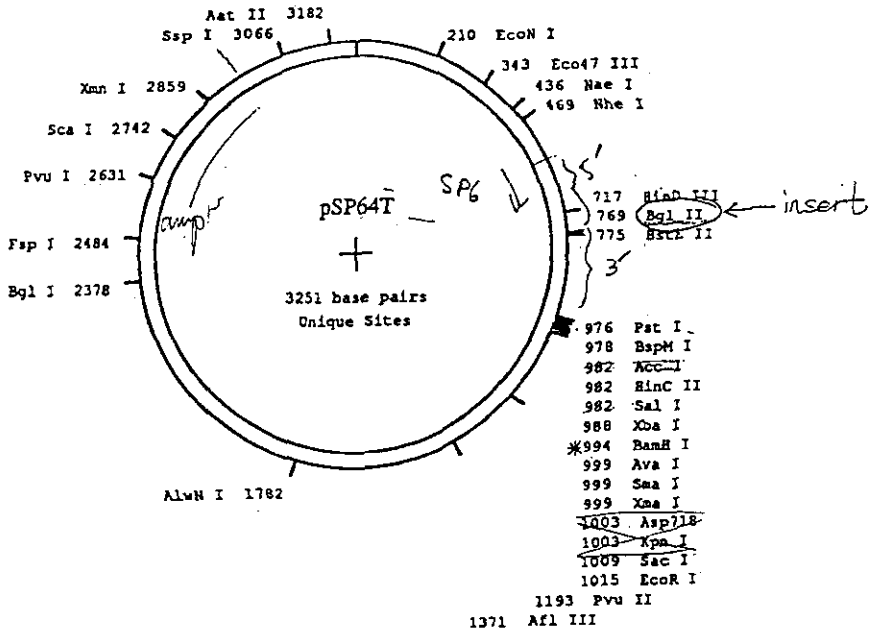
This is the sequence of pRSET
 The polylinker region spans bases 2705-2751
 The metal binding domain spans bases 2816-2830
 The T7 promoter spans bases 2904-2921
 The F1 origin spans bases 2042-2497
 The Ampicillin resistance gene spans bases 996-1856



C pVL1392/1393 TRANSFER PLASMID MAP



Reference: Webb and Summers (1990) Technique in press.



Swenson

Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*

D. RODRÍGUEZ-CONTRERAS¹, P. J. SKELLY², A. LANDA², C. B. SHOEMAKER²
and J. P. LACLETTE^{1*}

¹ *Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas and* ² *Department of Microbiology and Parasitology, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, 04510 México D.F.*

³ *Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, 665 Huntington Ave., Boston MA 02115, USA*

(Received 9 February 1998; revised 1 May and 22 June 1998; accepted 22 June 1998)

SUMMARY

Tapeworms absorb and consume large quantities of glucose through their syncytial tegument, storing the excess as glycogen. Although some studies on the metabolism of glucose in several tapeworms are available, the proteins that mediate its uptake and distribution in their tissue have not been identified. We describe the isolation and characterization of cDNA clones encoding 2 facilitated diffusion glucose transporters (TGTP1 and TGTP2) from *Taenia solium*, the causal agent of human and porcine cysticercosis. Radio-isotope labelled hexose uptake mediated by TGTP1 expressed in *Xenopus* oocytes is inhibited by the natural stereoisomers D-glucose and D-mannose but not by L-glucose. Transport by TGTP1 is sensitive to classical inhibitors of facilitated diffusion such as phloretin and cytochalasin B, and insensitive to ouabain. TGTP2 did not function in *Xenopus* oocytes. Localization studies using specific anti-TGTP1 and anti-TGTP2 antibodies show that TGTP1 is abundant in a number of structures underlying the tegument in adult parasites and larvae, whereas TGTP2 appears to be localized only on the tegumentary surface of the larvae and is not detected in adults.

Key words: facilitated diffusion glucose transporter, tapeworm parasites, *Taenia solium*, cysticercosis, cDNA, localization, tegument.

INTRODUCTION

Tapeworms lack a digestive tract and carry out metabolic exchange with their host through the syncytial tegument. When glucose is available, the parasites absorb and consume large quantities, storing the excess as glycogen (Roberts, 1983). Adult worms live in the intestine of vertebrates and require carbohydrates in the host diet for their normal development and reproduction (Read & Simmons, 1963). The larval stages, or metacercodes, lodge in the tissues of their intermediate hosts where surrounding fluids provide nourishment. Their maturation can be accelerated *in vitro* by culturing in a glucose-rich medium (Graham & Berntzen, 1970).

Substantial research on the acquisition, storage and catabolism of carbohydrates in tapeworms has been previously reported. For example, uptake of glucose through a mediated system has been demonstrated in several species of cestodes (Pappas & Read,

1975). Uptake by adult worms has been reported to be driven by a Na⁺-dependent active transport system, similar to counterparts in the vertebrate intestine (Pappas & Read, 1975; Pappas, 1983). Metacercodes appear to take up carbohydrates by passive as well as active transport (von Brand *et al.* 1964; Arme, Middleton & Scott, 1973; Pappas, Uglem & Read, 1973; Pappas, 1983; Rosen & Uglem, 1988). In *H. diminuta*, both types of transport have been localized in different tissues of the infective cysticercoid; facilitated diffusion is associated primarily with the cyst wall and is lost when the larva excysts in the vertebrate host, whereas Na⁺-dependent active transport is associated with the external plasma membrane of the scolex (Rosen & Uglem, 1988).

The molecules that mediate the uptake and distribution of carbohydrate in the tissue of the cestodes have not previously been identified. In this report, we describe the isolation and characterization of 2 cDNA clones containing the complete coding sequence for 2 glucose transporter homologues of *T. solium* (TGTP1 and TGTP2). TGTP1 has been functionally expressed in *Xenopus* oocytes and shown to have properties typical of facilitated diffusion

* Corresponding author: Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM A.P. 70228, 04510 México D.F., México.
Tel: +525 622 3844. Fax: +525 622 3369. E-mail: laclette@servidor.unam.mx

glucose transporters. Immunolocalization studies indicate that TGTP1 is abundant in a number of structures underlying the tegument of larval and adult *T. solium*; its homologues are also present in *T. saginata* and *T. crassiceps*. In contrast, TGTP2 appears preferentially on the external surface of larval-stage parasites.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and characterization of T. solium glucose transporters (TGTP) cDNA

A probe was obtained by PCR amplification of *T. solium* cysticerci cDNA, using degenerate primers designed from conserved amino acid sequence motifs of human (GLUT1) and *Schistosoma mansoni* (SGTP1, 2 and 4) facilitated diffusion glucose-transporters (see Fig. 2 in Skelly *et al.* 1994). The sense primer TGTP-2cg (5'-CAGCAGTTCTCCGGCAT(A/C/T)AA(C/T)G-3') was designed from amino acid positions 281-288 in SGTP1, and the antisense primer TGTP-3cg (5'-TCGTCGAA-GGTGCGGCCCTT(A/C/G/T)GT(T/C)TC-3') from position 460-468. PCR utilized 25 cycles, annealing at 50 °C/60 sec, extension at 72 °C/60 sec and denaturation at 94 °C/60 sec. The product was ethanol precipitated and run on a 1% agarose gel, and the region of the gel containing DNA of approximately 550 bp was excised, purified by glass affinity and used as a template in a second PCR under the same conditions. The now apparent amplified 550 bp DNA fragment was radio-isotope labelled with the Random Primed DNA Labelling Kit (U.S.B. Corp., Ohio) and [α^{32} P]dATP (Amersham International plc) and used to screen about 80000 plaques of a *T. solium* cysticerci cDNA library prepared as previously described (Landa *et al.* 1993). Hybridization was carried out at high stringency (65 °C, 2 \times SSC), and several positively hybridizing plaques were isolated, each representing isolates of TGTP2 cDNA.

A second strategy for isolating glucose transporter clones from the cysticerci cDNA library was to use a 1 kb DNA probe containing the amino-terminal coding end of the *S. mansoni* glucose transporter SGTP1 as a probe (Skelly *et al.* 1994). The amplified DNA fragment was radio-isotope labelled and used to screen the cDNA library at low stringency (50 °C, 6 \times SSC). This strategy resulted in the isolation of TGTP1 cDNA clones.

The inserts in all selected clones were subcloned into M13 vectors and sequenced by the dideoxy chain-termination method (Sanger, 1977). The complete sequences were obtained from both strands of the cDNA using synthetic oligonucleotides. Sequences included in this paper have been submitted to the GeneBank with accession numbers: U39197 (for TGTP1) and U62917 (for TGTP2).

Functional expression of TGTPs in Xenopus oocytes

Functional expression of the 2 TGTP cDNA clones was characterized essentially as described by Skelly *et al.* (1994). Briefly, the complete coding regions of the 2 glucose transporters were amplified by PCR and ligated into the *Xenopus* expression vector, pSP64T. Linear DNA was prepared from the resulting plasmids and used to synthesize RNA *in vitro*. Approximately 50 ng of RNA were injected into each *Xenopus* oocyte. For analysis of glucose uptake, groups of 5-6 oocytes were incubated at room temperature in a buffer containing 0.1 mM 2-deoxyglucose, 1 μ Ci/ml [1,2- 3 H]2-deoxyglucose for 1 h. Individual oocytes were washed, solubilized with 0.2 ml of 2% SDS and the incorporated radioactivity was evaluated by liquid scintillation counting. The effects of several sugars and inhibitors (at 10 mM and 1 mM, respectively) on the transport of 2-deoxyglucose were studied. When assaying the effects of the inhibitors, the oocytes were pre-incubated with the compounds 30 min prior to the start of the transport assay. To evaluate the effect of sodium on glucose transport, choline chloride (100 mM) replaced NaCl in the buffer. Experiments were undertaken twice, and the data are presented as the mean \pm the standard deviation of uptake by at least 4 individual oocytes. Data were compared by Student's two-tailed *t*-test ($P < 0.05$).

Localization studies

T. solium cysts were dissected from skeletal muscles of infected pigs obtained in Mexico City. *T. crassiceps* cysticerci (ORF strain) were obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice and maintained in the laboratory. *T. saginata* adult worms were kindly donated by A. Aluja, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, and *T. solium* adult worms were obtained from experimentally infected hamsters (kindly provided by J. Ambrosio and A. Flisser, Facultad de Medicina, UNAM). All larvae and adult worms were washed 3 times with sterile phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS) and used immediately for localization studies or stored at -70 °C until use.

For the preparation of a specific antiserum, 2 peptides were synthesized (C. Dahl, Harvard Medical School), based on the extrapolated amino acid sequence at the carboxyl-terminus of both TGTP1 (NH₂-CEAATALRRSDEEDAKVDA-COOH) and TGTP2 (NH₂-CRSLPSENGENMTKSDR-VKF-COOH), with a cysteine added to the amino terminus of each peptide for coupling to a carrier. Peptides were coupled to BSA and to ovalbumin, and the BSA-coupled peptides were injected subcutaneously into rabbits as previously described (Zhong *et al.* 1995). Immune sera were collected, and

Table 1. Amino acid sequence comparisons of TGTP1 and TGTP2 from *Taenia solium* with several glucose transporters from other organisms

| Protein* | TGTP1 (%) | | TGTP2 (%) | |
|----------|-----------|------------|-----------|------------|
| | Identity | Similarity | Identity | Similarity |
| TGTP2 | 28.0 | 47.2 | — | — |
| GLUT1 | 31.9 | 49.2 | 37.2 | 53.0 |
| GLUT3 | 30.8 | 48.8 | 37.3 | 53.6 |
| GLUT4 | 32.2 | 49.9 | 36.0 | 52.3 |
| SGTP1 | 56.2 | 67.6 | 26.9 | 43.8 |
| SGTP2 | 25.2 | 42.1 | 41.9 | 56.0 |
| SGTP4 | 47.9 | 64.6 | 27.7 | 47.3 |

* TGTP1 and 2 are *T. solium* glucose transporters; GLUT1, 3 and 4 are human glucose transporters; SGTP1, 2 and 4 are *Schistosoma mansoni* glucose transporters.

the anti-peptide antibodies were purified by affinity chromatography to the ovalbumin-coupled peptides conjugated to NHS-activated HiTrap columns (Pharmacia Inc.). Retained antibodies were eluted in 0.1 M glycine, pH 2.5, neutralized with Tris, pH 8, and dialysed exhaustively against PBS. Purified antibodies against the C-terminal peptides are referred to as anti-TGTP1 or anti-TGTP2.

Immunofluorescence microscopy was performed on frozen sections of the parasite tissues. Sections 6–8 μ m thick were air dried on poly-L-lysine coated slides, rehydrated with PBS, pre-incubated for 30 min with 20% normal goat serum in PBS as a blocking reagent, washed with PBS-0.15% Tween 20, and incubated overnight at 4°C with the anti-TGTP1 or anti-TGTP2 antibody fractions (100 μ g/ml in PBS-0.15% Tween 20, 3% BSA). Slides were extensively washed and incubated in the dark for 1 h at room temperature with a fluorescein-conjugated F(ab)₂ goat anti-rabbit IgG (Boehringer Mannheim, Biochemicals) at 2 μ g/ml. The slides were washed again and mounted with cover-slips using 1:9 glycerol-PBS. Control sections were incubated with the second antibody only. All sections were photographed in a Nikon Optiphot Epi-fluorescence microscope.

Expression of TGTPs in insect cells

For the recombinant expression of the TGTP1 and TGTP2 in insect cells, the complete coding sequences of TGTP1 and TGTP2 were amplified by PCR as described earlier and subcloned into the baculovirus vector pVL1393. Recombinant plasmids containing TGTP1 and TGTP2 coding sequences in the correct orientation and baculovirus DNA were used to co-transfect Sf9 cells as described previously (Zhong *et al.* 1995). Detection of TGTP1 and TGTP2 in membrane fractions of transformed insect cells after 48 h of infection, and of *T. solium* and *T. crassiceps* cysts, was carried out by Western blot

(Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Membrane fractions from Sf9 cells and cysts were prepared as described by Zhong *et al.* (1995), except that frozen cysts were homogenized using a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments) at maximum speed for 1–2 min at 4°C before sonication. A goat anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase (Sigma) 1:1000 dilution was used as second antibody and detected by reaction with 0.05% 4-chloro-1-naphthol.

RESULTS

Characterization of 2 *T. solium* glucose transporter cDNAs

Two full-length cDNA clones were obtained from a *T. solium* cysticerci cDNA library with probes based on homologies to conserved amino acid sequence motifs of human and *Schistosoma mansoni* glucose transporters as described in the Materials and Methods section. One 1.8 kb clone showed strong coding homology to the *S. mansoni* glucose transporter, SGTP1, and was designated TGTP1. A second 1.7 kb clone was designated TGTP2 because of its greater coding homology with SGTP2, a *S. mansoni* glucose transporter homologue (Table 1). Extensive efforts to amplify additional TGTP cDNAs with other conserved sequence motif primer combinations, or low stringency hybridization with *S. mansoni* glucose transporter cDNA clones were unsuccessful. TGTP1 and TGTP2 have 3'-untranslated regions of 235-bp and 136-bp, respectively, ending in poly-A tails, whereas only TGTP2 has the typical consensus poly(A) addition site (AATAAA), 20-bases upstream of the poly-A tract.

The predicted translation products of TGTP1 and TGTP2 encoded proteins with characteristics typical of facilitated diffusion glucose transporters (Mueckler *et al.* 1985). They were about 55 kDa each with 12 predicted transmembrane α -helices, relatively large hydrophilic loops between transmembrane helices 1–2 and 6–7, and hydrophilic sequences at the amino- and carboxyl- ends (Fig. 1). A single putative N-linked glycosylation site on the first external loop, typical of eukaryotic transporters, was present only in TGTP1. Absence of this site has been reported in glucose transporters of plants and protozoa (Stack, Stein & Landfear, 1990; Langford *et al.* 1994; Sauer & Tanner, 1989; Stadler *et al.* 1995). In addition to their structural similarities, both proteins have substantial levels of protein sequence identity and similarity to all known members of the superfamily of facilitated diffusion glucose transporters. TGTP1 shows 56% identity and 67.6% similarity with SGTP1, whereas TGTP2 is most closely related with SGTP2 (42% identity and 56% similarity). Identity between TGTP1 and TGTP2 is only 28% (see Table 1).

| | | |
|-------|---|-----|
| TGTP1 | MKGISGEVLVAIFETTCFGSSFLLYNIGVANLPGDNKKFLVNY | 44 |
| TGTP2 | MVNHI.F.TVVIV...QP.FQT..I.S.LPL.E.YILSI | 42 |
| GLUT1 | MEPSS.KLT.R.M.VGGAVL...IQF...T.I.A.QKV.EE.YNOT | 47 |
| GLUT3 | HGTQKVFRA.FF.TVATI...QF...T.I.A.EKI..I.INKT | 45 |
| GLUT4 | MPSGFQQTGSEDEGPPQQRVT...V.SAVL...IQF...I.I.A.QKV.EQSYNET | 59 |
| SGTP1 | MGVASNN..T.K...TVLI..V.....L...RR...EIVYNET | 49 |
| SGTP2 | MRQLKFF.PYCIITL...PF..HT..I.A.A.L..S.INTT | 42 |
| SGTP4 | MGGG.KFTKS.S.SVLLA.L...TI.....L...E...E...SRT | 47 |
| TGTP1 | YKPN-----SSALNANFLYQVTSVLVICAALAAFTCGMVADGLGRUSLMMVINGIC | 97 |
| TGTP2 | CEDR-----GSSPSPPEFVQMSLS.VAGFP.GGIFG.LFG.S.SNMC...L..FIF.IEM | 97 |
| GLUT1 | WVRY-----GESILPPTLTT.WLSVAIFSVGGM.GS.SV.LFVNRF..RN.MLHM.LLA | 103 |
| GLUT3 | LTDK-----GNAPPSEVLITS.WLSVAIFSVGGM.GS.SV.LFVNRF..RN.MLIV.LLA | 101 |
| GLUT4 | WLGROGPEGPSSIPGTLTT.WLSVAIFSVGGM.SS.LI.IISQM.....AML...VLA | 119 |
| SGTP1 | VV.NT-----PE.DSS.F.TH.STIF.VA...G..S.....RNG.II..V.. | 101 |
| SGTP2 | LAARSVTCDE----RFIDL.WSLCVTSFLGGFPGGLIG.VL.NK...N..FLLSIPT | 97 |
| SGTP4 | MLGK.ASEAENTANL.VTSS...A..STAF.VAG..G..S..AI..C...RNG.I..SLLA | 107 |
| TGTP1 | IVGSSVSSVQVVAQPALLVGRAISGLNSGLSIGIAAHFITEIAPRHAGMIGACWLA | 157 |
| TGTP2 | A...LILMA.GA.VSPEMII...YLV.FAC.AFT...PVI.A...VRI...S.IEM... | 157 |
| GLUT1 | F.SA.LMGFSLGKSFEM.II..F.I.VIC..TT.FVP.YVG.VS.TAF..AL.TLH..G | 163 |
| GLUT3 | VT.GCFKGL.K.KSVEM.II..LVI..FC..CT.FVP.YIG..S.TA...AF.TL...G | 161 |
| GLUT4 | VL.GSLMGLANP.ASYM.II..FLI..AT...TS.LVP.YVG...T...AL.TL...G | 179 |
| SGTP1 | I.G.VGP..LWK...FVH.I...IT...SLV...V...D...G...H...V | 161 |
| SGTP2 | VI...LILMFSKM.QSPEMII..STI.IAC.ANTVGP...S...VNF..AA.TE..FV | 157 |
| SGTP4 | .I.G.ILVGPF..AYS...P...VFN.F.F.I.M...P.Y...LS...G..SLM... | 167 |
| TGTP1 | ITIGIVISYVLTLSHLNTPFLRVPVNGVGLPAVIALIISPTFVSPRMVLKCKDKA | 217 |
| TGTP2 | VKA.L.QI.G.KE.MGSAK...YLL.LTI..S.VL.FLWTCFD...YIL.NSQ.LES | 217 |
| GLUT1 | VV..L.AQ.PG.DSIMGKND...LILSIIF..LLQC.VI..CP...F.LIMRN.NR | 223 |
| GLUT3 | VV..LVAQIFG.EFI.GSEE...LIL.FTIL..ILQSAAL..CP...F.LIMR.EEN | 221 |
| GLUT4 | V...L.AQ..G.E.S..G.AE...LIL.FTI..ILQSAAL..CP...F.LIMR.EEN | 239 |
| SGTP1 | V..AF..FI.FTE...L.N...L.VAL..V..A.S.VTI..CP...F.M..HK.AE | 221 |
| SGTP2 | VSA.L..Q..S.PEVMG.TE...YLAALCTVSS..HILLFTCP...TY..II.G.RRR | 217 |
| SGTP4 | L...LV..LM..TYT...ISVA..SV..L...LL.YCP...F.FI..GK.AK | 227 |
| TGTP1 | AREAFARINGSND-MEIAEMR-EELEVAQNPPEFKTEFRRRDRMPVIAVLQVM | 275 |
| TGTP2 | KS.LFWLR.DTE.VEEE.G.LIA.QENESE.HTK.PLKD...VKA..LALFV..VAHLA | 277 |
| GLUT1 | KSVLKCLR.TAD.T.HDIQ..K...SRMQRKQVITL...SPAY.Q.II..SVL.S | 281 |
| GLUT3 | KQILQ.LW.TQD.S-QD.Q..K-D.SARMSQKQVTVL...VSSY.Q.I..SVL.S | 279 |
| GLUT4 | KQILQ.LW.TQD.S-QV.L..LK-D.KRKLREPRSLIQ.LGS.TH.Q.L...VL.S | 297 |
| SGTP1 | .K..LQL.VK...T..G.L...I...K...V...Q..TO...L.C...L | 279 |
| SGTP2 | SEN.LVYLR.QOCDV-HAEL.LL-KLETEQSSHTKSNVCD.L.IPY..WGL.V.LVPHIG | 275 |
| SGTP4 | .K..Q.L.CIDDIN-ETFN..K.R.MHE.EKR.K...FR..TO...L..CI...F | 285 |
| TGTP1 | QQLSGINAVVANSSEMLKSAKVSPLMLEYFVWGLLNICTIVALELLEKAGRTLLM | 335 |
| TGTP2 | .F...ALFY.TSLFE.IGLT.XQ-AV.ATL.V.SHI.VI.VASIF.I.RV...I..IG | 336 |
| GLUT1 | ...FY.TSIFK.G.-QGV.ATL.S.IV.TAF.V.S.PVV.R...R.I | 339 |
| GLUT3 | ...FY.TSIF.D.G.-QEPI.ATL.A.VV.T.F.V.S.F.V.R...RM | 337 |
| GLUT4 | ...FY.TSIFET.G.-QGPA.ATL.A.VV.TVP.L.SVL.V.R...R.L | 355 |
| SGTP1 | ...TY..L..EL.GIPDY.Q.C.FRI.V...V.V.S...I.R...S | 335 |
| SGTP2 | ...F...GIIYFVSLFL.WGLTKQVNS.NML.T.VTIL.GAFASIFVDRK...P.MP | 335 |
| SGTP4 | ...ITY..T...T..GIFLVYIQR..AVPAI..LM.VLSVY.I.R...S | 345 |
| TGTP1 | PSLVVAI.LILLLIVFNIDANVGNVNT-PEVLSVAVLVIYVAAFMGLGMPALIVAE | 395 |
| TGTP2 | GLS.M.FSAVITL.GLAIRSHASV.V-----YLAITF.Y.F.GG..I.E.SI.WFV... | 390 |
| GLUT1 | GLAGM.GCAI.MT.ALALLKQIPNMS-----YI.I.AL.GF..F.EV.P..I.WF... | 393 |
| GLUT3 | GLGGM.FCST.MTVSLLLKDNVWMS-----F.CIGAILVP..F.EI.P..I.WF... | 391 |
| GLUT4 | GLAGMOCAI.MYVALLLKERVWMS-----Y..I.AL.GF..F.EI.P..I.WF... | 409 |
| SGTP1 | .TVSL.LS...T...NLS.DS.PQST.N-AMGII.II.II..ICS..L...V...S | 398 |
| SGTP2 | GTS.CLFS...FTLTLI.KQVTEINGL.ILSIVLTYTEL.GFSVS-----I.WFL.S | 388 |
| SGTP4 | .TVLL.FS..C.T.S.D...SSTKQPTARTAGII...IILTCG..L...I.GV... | 405 |
| TGTP1 | IFROGPRAAAYSLSQSIQWACNLIVVASFPSSNELLKGVYLYPLVVAWVWVFLMMP | 454 |
| TGTP2 | M.V.ET.DP..IVITVIVN.LAQIVISLGY.P.LKY..D.SEM.FIGLVIFFIALLYF.L | 450 |
| GLUT1 | L.S...P..I.AVAGFSN.TS.F.G.MC.QYVEQ.CGP..FI PT.LLVLFIFITFKV | 453 |
| GLUT3 | L.S...P..I.AVAGFSN.TS.FL.GLL...AAHY.GA..FI PTGLITLFAFT.FKV | 451 |
| GLUT4 | L.S...P..I.AVAGFSN.TS.F.IGM.QYVA.AMGP..F.LFA.LLCCFPIET..RV | 469 |
| SGTP1 | ...LS...LC.Y.VIQKNG..SF..F...VE..IF... | 458 |
| SGTP2 | L.T.EN.D.V.IAAATN.L.A.AZI..Q.VIYIGI.SF.I.CALL.VLIFVG.YL | 448 |
| SGTP4 | ...E...G.VNLL...L.F.Y..I.DAIH.SF..F..I.I..IF...Y.I | 465 |
| TGTP1 | ETQNRITFDEVARDLAFCSTVVGKNTAALQAPVTEKEDDEEAATLRRSDEEDAKVA | 510 |
| TGTP2 | ...G.APCD.QQEPVMTGGAEIPVTLGSTRSLPSNGENMTKSDRVKF | 500 |
| GLUT1 | ...G...I.SGPRQ.GASQDK.PEELFHLGADSQV | 492 |
| GLUT3 | ...RG...EDIT.AFGQAGADRSGKGVMEHNSI.PAKETITNV | 496 |
| GLUT4 | ...RG...QISAAHRTSLLDQEVKPFTELEYLGP..ND | 509 |
| SGTP1 | ...N...T..EDNML.VETKQGNNEGA.ESLLYPRSDNDKG | 518 |
| SGTP2 | ...GK.PASTEDYRWRGSR.T.AHEMPTETDID.I.TQY | 489 |
| SGTP4 | ...C.SN...TAKV.ACC.PSR.TYKNEEPIYSDE | 505 |

SGTP1 MFA

521

Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequences of *Taenia solium* TGTP1, TGTP2 and other glucose transporters. GLUT1, GLUT3 and GLUT4 are human glucose transporters (Kayano *et al.* 1990); SGTP1, SGTP2 and SGTP4 are *Schistosoma mansoni* glucose transporters (Skelly *et al.* 1994). Positions of amino acid identity with TGTP1 are shown as a dots. Hyphens indicate gaps introduced to maximize alignment. Underlining shows the putative membrane-spanning segments determined using the algorithm of Eisenberg *et al.* (1984).

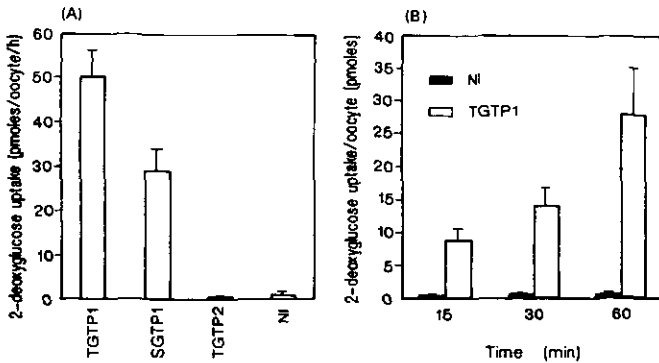


Fig. 2. Functional expression of the TGTP1 in *Xenopus* oocytes. (A) Transport of 2-deoxyglucose by oocytes injected with TGTP1, TGTP2 and SGTP1 cRNA. The basal transport is represented by uninjected oocytes (see Materials and Methods section). (B) The 2-deoxyglucose transport versus time by oocytes injected with TGTP1 cRNA compared with uninjected oocytes (NI). Data are represented as the mean \pm standard deviation of uptake by 4–5 individual oocytes of a representative experiment.

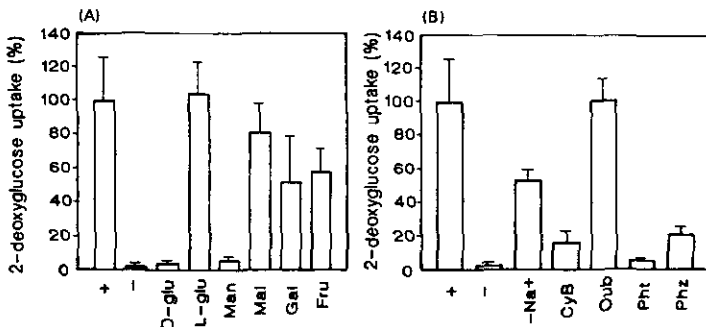


Fig. 3. Sugar specificity and sensitivity to inhibitors of TGTP1 cRNA injected oocytes. (A) Effect of competing 10 mM sugars on the transport of 2-deoxyglucose by oocytes injected with TGTP1 cRNA. The values for uninjected (-) and positive control (+) oocytes, were obtained in the absence of competing sugar. D-GLU, D-glucose; L-GLU, L-glucose; MAN, D-mannose; MAL, D-maltose; GAL, D-galactose; FRU, D-fructose. (B) Inhibition of 2-deoxyglucose transport by several potential transport inhibitors at 1 mM. Uninjected (-) and positive (+) control oocytes, were obtained in the absence of inhibitors. -Na, oocytes injected with TGTP1 RNA incubated in buffer lacking sodium; CyB, cytochalasin B; Oub, ouabain; Pht, phloretin; Phz, phlorizin. The 2-deoxyglucose transport by the oocytes injected with TGTP1 cRNA in the absence of sugar competitors or inhibitors was set to 100%.

Functional expression of *T. solium* glucose transporters in *Xenopus* oocytes

To functionally characterize the *T. solium* glucose transporters, the coding DNA of both TGTP clones were expressed in *Xenopus* oocytes. Oocytes were injected with coding RNA that was produced *in vitro* and then measured for their ability to take up radioisotope labelled 2-deoxyglucose as compared with uninjected control oocytes. As shown in Fig. 2, oocytes injected with TGTP1 RNA, took up sig-

nificantly more 2-deoxyglucose than controls, and uptake was linear over a 60 min incubation. Oocytes injected with TGTP2 RNA had no increased glucose uptake during a 60 min incubation, as was previously found for its *S. mansoni* homologue, SGTP2 (Skelly *et al.* 1994). The oocyte expression system was used to characterize the substrate specificity of TGTP1. Sugar stereospecificity was assessed by competition studies using either D-glucose or L-glucose (Fig. 3A). The natural stereoisomer D-glucose, but not L-glucose, competed effectively for transport of

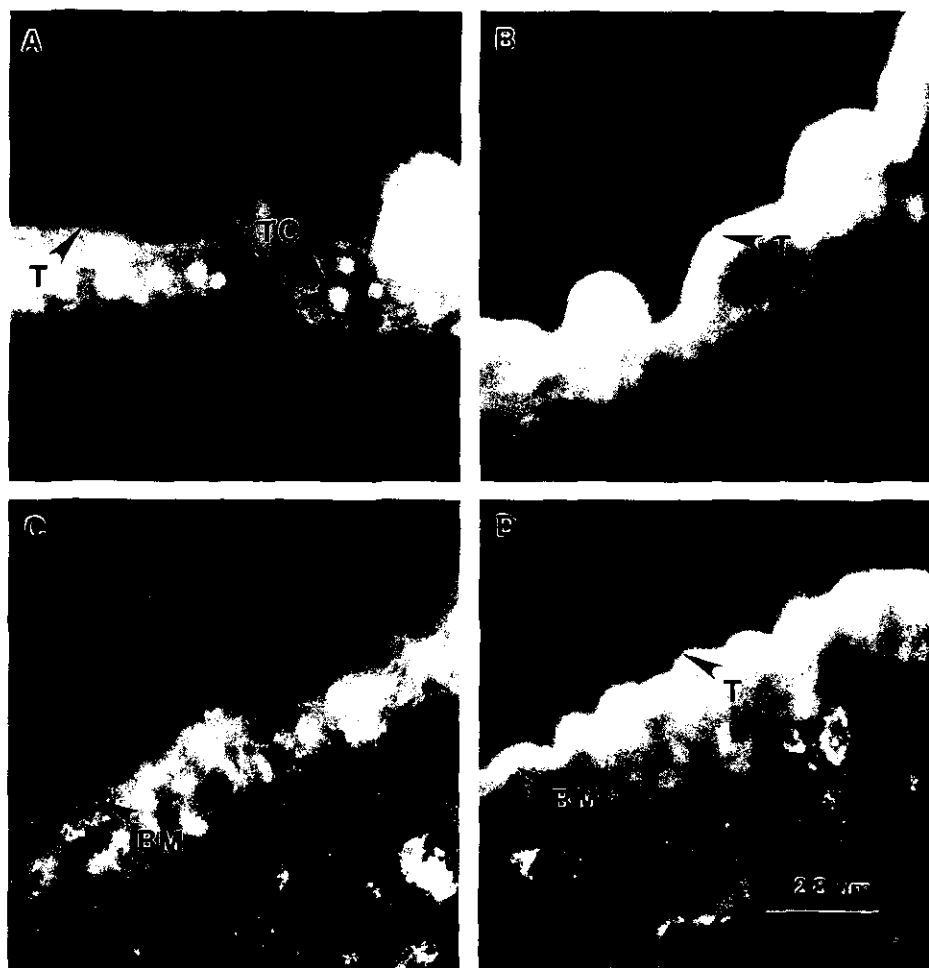


Fig. 4. Immunolocalization of TGTP1 and TGTP2 in tissue sections of *Taenia solium* (A and B) and *T. crassiceps* (C and D) larvae. Tissue sections were initially incubated with anti-TGTP1 (A and C) or anti-TGTP2 (B and D) affinity-purified antibodies and developed with a fluorescent anti-rabbit IgG. Control sections incubated in the absence of primary antibody did not show any fluorescence (not shown). BM, basal membrane; TC, tegumental cytons; T, tegument.

2-deoxyglucose. Transport inhibition studies were also carried out using the *D*-isomers of the following sugars at 10 mM; mannose, maltose, galactose and fructose (Fig. 3A). Mannose inhibited uptake to a level similar to that observed with *D*-glucose, whereas galactose and fructose were much less inhibitory. Maltose did not significantly inhibit glucose uptake by TGTP1 ($P > 0.05$). The inhibitor of facilitated glucose transporters, phloretin, completely abolishes TGTP1-dependent glucose transport at 1 mM (Fig.

3B). Cytochalasin B, another inhibitor of facilitated glucose transporters, decreases glucose transport by TGTP1 by 80%. In contrast, no differences in the glucose uptake were seen when the oocytes were incubated in the presence of ouabain, which disrupts sodium movement by inhibiting the sodium/ATPase pump. These results demonstrate that the translation product of TGTP1 is a facilitated diffusion glucose transporter. Somewhat surprising was the moderate reduction in activity detected when sodium was not

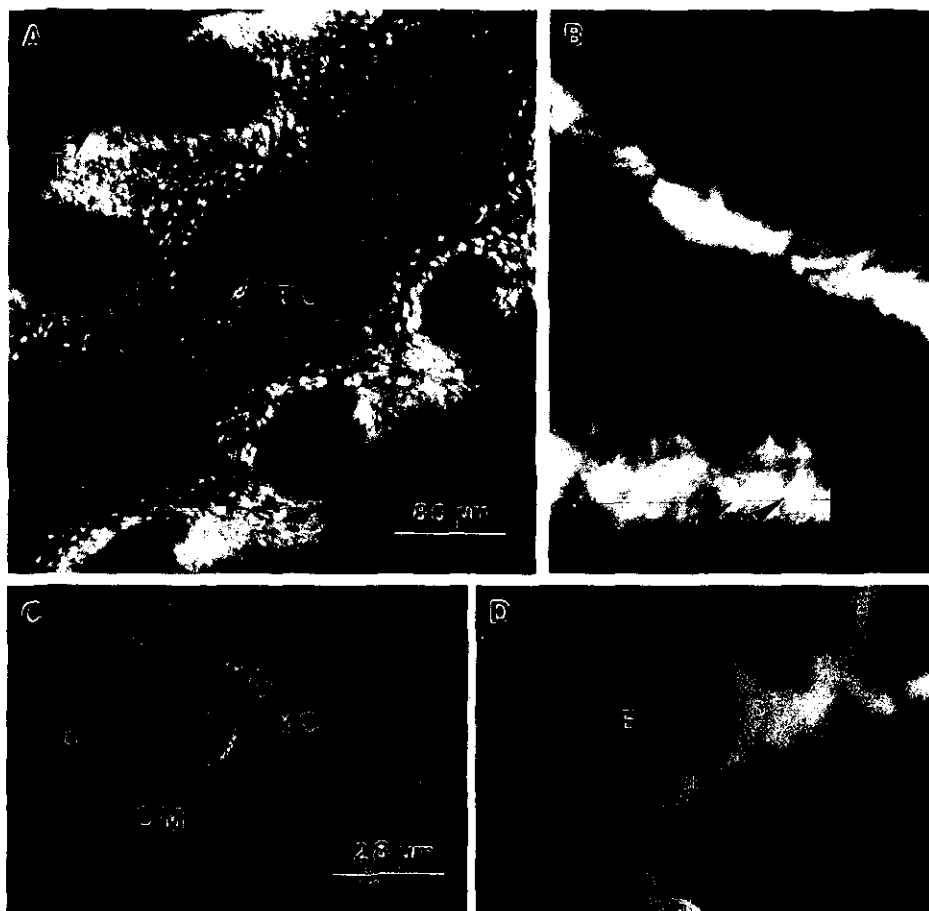


Fig. 5. Immunolocalization of TGTP1 in tissue sections of adult *Taenia solium* (A) or *T. saginata* (B and C). Sections were initially incubated with anti-TGTP1 affinity-purified antibodies and developed with fluorescent anti-rabbit IgG. Insert shows higher magnification ($\times 60$). (C) Staining of eggs within the uterus of *T. saginata*. (D) Control staining, in the absence of primary antibody. Equivalent tissue sections stained with anti-TGTP2 antibodies and in the absence of the primary antibody did not show any fluorescence (data not shown). EC, excretory canals; E, embriophore; OM, oncospherical membrane; YC, yolk cell; arrows downwards show the cytoplasmic canals and arrows upwards show the tegumental cytons.

included in the medium, and the clear sensitivity to phlorizin, another inhibitor of sodium-dependent sugar transport.

Immunolocalization of TGTP1 and TGTP2 in *Taenia* parasites

Specific rabbit antisera against TGTP1 and TGTP2 were elicited with peptides corresponding to the carboxyl terminus of the 2 glucose transporters. For localization studies, antibodies were purified by antigen affinity. The resulting antibody preparations

recognized proteins of about 40–45 kDa in Western blots containing membrane fractions from *T. solium* cysts (data not shown). The specificity of each antibody was demonstrated on Western blots containing membrane fractions of recombinant insect cells expressing 1 of the TGTPs. In each case, a broad band of about 40–45 kDa in the relevant membrane fraction from recombinant insect cells was apparent and the antibodies did not recognize the other TGTP (data not shown).

Immunofluorescence was carried out on frozen sections from the bladder wall of *T. solium* larvae and

showed that TGTP1 was localized in the tegument as well as in several structures underneath its basal membrane, including the tegumental cytons and other cellular types (Fig. 4A). Similar observations were made in localization studies of TGTP1 in *T. crassiceps* cysts, with a less intense fluorescence in the tegument (Fig. 4C). At higher magnification fluorescence appeared patchy, suggesting association of TGTP1 with the vesicular bodies within the tegument, the cytoplasmic canals and the cytons (not shown). Immunolocalization of TGTP1 on adult worm sections from *T. solium* and *T. saginata* also revealed localization in a number of structures underneath the tegument including cytons, muscle cells and deeper cellular bodies in the vicinity of the excretory canals which might correspond to the canal bodies and flame cells (Fig. 5A and B). The TGTP1 could also be visualized on sections of eggs inside the uterus of a gravid proglottid of *T. saginata*, within the yolk cell, and in the oncosphere membrane (Fig. 5C). These observations suggest that TGTP1 is involved in the uptake of glucose into a diversity of *T. solium* tissues in all developmental stages.

Immunolocalization of TGTP2 on frozen sections from the bladder wall of both *T. solium* and *T. crassiceps* cysts showed an intense fluorescent strip on the external surface of the tegument and a diffuse fluorescence underneath (Fig. 4B and D). In contrast to TGTP1, no TGTP2 could be localized on adult worms sections from *T. solium* and *T. saginata*, nor in eggs within a gravid proglottid of *T. saginata*, suggesting that its expression is developmentally regulated and restricted to the cyst stage.

DISCUSSION

The lack of an alimentary canal in cestodes defines the physiology of this group because the body-covering or tegument not only provides protection against the environment and the host immune response, but carries out both absorption of nutritive molecules and excretion/secretion of waste materials (Smyth, 1994). Adult *T. solium* are elongated worms that only live in the intestine of human beings, whereas the larval stage, or cysticercus, is a cystic organism that can survive for long periods in a diversity of tissues of its intermediate host, usually pigs. In this context, glucose transporters were expected to be associated with the tegument on the external surface of both adult and larval forms and may be candidates for intervention against the parasite. For example, glucose transporters exposed on the tegumentary surface could be potential vaccine targets for the induction of protective immune responses within hosts.

We have isolated and characterized cDNA clones encoding 2 distinct *T. solium* proteins showing

substantial amino acid sequence identity with the members of the facilitated diffusion glucose transporter family. Functional expression of TGTP1 in *Xenopus* oocytes confirms its role as a facilitated glucose transporter. Results from immunolocalization studies indicate that both proteins are expressed in *T. solium* and other taeniid species (see below). These proteins, designated TGTP1 and TGTP2 according to their homology to *Schistosoma mansoni* transporters, are the first glucose transporters characterized for cestodes.

The high amino acid sequence identity (56%), and similarity (68%) of TGTP1 and its counterpart from the trematode *S. mansoni*, SGTP1, as well as their similar sugar specificity, support the concept that both proteins are orthologous transporters in cestodes and trematodes. The partial sensitivity to Na and to phlorizin in transport assays using whole cestode larvae (von Brand *et al.* 1964; Arme *et al.* 1973; Pappas *et al.* 1973), have been interpreted as indicative of the simultaneous operation of the 2 distinct types of glucose transport, i.e. active and facilitated, in larval cestodes (Pappas, 1983). In fact, removal of the cyst wall during excystment allowed the localization of an active transport in the scolex and a facilitated diffusion in the wall of cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* (Rosen & Uglem, 1988). Our observations that TGTP1 is significantly sensitive to sodium and phlorizin, as well as its wide distribution in the tissues of adult and larval taeniids, suggests that TGTP1 provides the sensitivity to sodium and phlorizin in the whole larva.

Our attempts to demonstrate functional expression of TGTP2 in the *Xenopus* oocyte system have been unsuccessful, similar to the experience with the related *S. mansoni* homologue, SGTP2 (Skelly *et al.* 1994). However, the presence of TGTP2 on the external surface of the tegument of *T. solium* and *T. crassiceps* cysts in immunolocalization studies suggests its role in sugar uptake. It is likely that the lack of function of TGTP2 is due to improper translation within oocytes, and/or improper transport to the plasma membrane. Also possible is that some aspect of the assay conditions inhibited TGTP2 function or that the transporter did not recognize 2-deoxyglucose, used in the assay.

Glucose transporters can be grouped in 2 distinct types; energy-dependent transporters able to take up glucose against a concentration gradient relying on an electrochemical potential, and the facilitated transporters that are energy independent and simply facilitate the diffusion of glucose down a concentration gradient (Lienhard *et al.* 1992). Among parasites, glucose transporters have been studied in *Leishmania* (Langford *et al.* 1994, 1995; Piper *et al.* 1995), *Trypanosoma* (Bringaud & Baltz, 1992; Tetaud *et al.* 1994), and *S. mansoni* (Skelly *et al.* 1994). The 2 glucose transporters of *T. solium* described here add to the list of known glucose

transporters in parasites. As expected, differences in the mechanism of glucose transport appear to emerge according to the life-style of the parasite developmental stage; *Trypanosoma* and *Leishmania* amastigotes, living within cardiac or reticuloendothelial cells of their hosts, require an active transport system to take up enough glucose from the internal milieu of those cells, whereas adult schistosomes residing in the bloodstream and taeniid larvae in the tissues of their hosts (e.g. central nervous system) live in glucose-rich environments where facilitated diffusion should suffice.

Immunolocalization studies show that TGTP1 is expressed in all developmental stages of *T. solium* and other taeniid species, whereas TGTP2 appears to be restricted to the larval stage or cysticercus. Moreover, TGTP1 appears to be localized in a variety of the cell types in the embryo, the larval and the adult stages, whereas TGTP2 appears to be predominantly localized on the surface of the cyst. This developmentally regulated expression and asymmetric location of the 2 glucose transporters is similar to observations from *S. mansoni* where SGTP1 is detected in membrane extracts of all life-cycle stages, being confined to the basal membrane and its dilations in the adult worm, whereas another transporter protein SGTP4 only appears to be exposed on apical membranes of the adult worm's tegument (Zhong *et al.* 1995; Skelly & Shoemaker, 1996). Perhaps trematodes and cestodes have developed analogous arrays, based on 2 distinct transporters, to take up and distribute glucose through the syncytial tegument to the internal tissues. In this respect it will be interesting to look for a counterpart of SGTP4 in adult *T. solium* and for SGTP2 on the apical membrane of larval stages of schistosomes.

This work was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, LOO42-M9607 (JPL) and M9308-3326 (AL), from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, IN-207195 (JPL), PADEF-030361 (DRC), and from NIH grant A128499 (CBS). We thank I. Ramirez and M. T. Merchant for technical assistance.

REFERENCES

- ARME, C., MIDDLETON, A. & SCOTT, J. P. (1973). Absorption of glucose and sodium acetate by cysticercoid larvae of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology* **59**, 214.
- BRINGAUD, F. & BALTZ, T. (1992). A potential hexose transporter gene expressed predominantly in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**, 111-122.
- EISENBERG, D., SCHWARZ, E., KOMAROMY, M. & WALL, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology* **179**, 125-142.
- GRAHAM, J. J. & BERNTZEN, A. K. (1970). The monoxenic cultivation of *Hymenolepis diminuta* cysticercoids with rat fibroblasts. *Journal of Parasitology* **56**, 1184-1188.
- KAYANO, T., BURANT, C. F., FUKUMOTO, H., GOULD, G. W., FAN, Y., EDDY, R. L., BYERS, M. G., SHOWS, T. B., SEINO, S. & BELL, G. I. (1990). Human facilitative glucose transporters. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 13276-13282.
- LANDA, A., LACLETTE, J. P., NICHOLSON-WELLER, A. & SHOEMAKER, C. B. (1993). cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Molecular and Biochemical Parasitology* **60**, 343-348.
- LANGFORD, C. K., KAVANAUGH, M. P., STENBERG, P. E., DREW, M. E., ZHANG, W. & LANDFEAR, S. M. (1995). Functional expression and subcellular localization of a high- K_m hexose transporter from *Leishmania donovani*. *Biochemistry* **34**, 11814-11821.
- LANGFORD, C. K., LITTLE, B. M., KAVANAUGH, M. P. & LANDFEAR, S. M. (1994). Functional expression of two glucose transporter isoforms from the parasitic protozoan *Leishmania enriettii*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 17939-17943.
- LIENHARD, G. E., SLOT, J. W., JAMES, D. E. & MUECKLER, M. M. (1992). How cells absorb glucose? *Scientific American* **266**, 86-91.
- MUECKLER, M., CARUSO, C., BALDWIN, S. A., PANICO, M., BLENCH, I., MORRIS, H. R., ALLARD, W. J., LIENHARD, G. E. & LODISH, H. F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-945.
- PAPPAS, P. W. (1983). Host-parasite interface. In *Biology of the Eucestoda*. Vol. 2 (ed. Arme, C. & Pappas, P. W.), pp. 297-334. Academic Press, London.
- PAPPAS, P. W. & READ, C. P. (1975). Membrane transport in the helminth parasites: A review. *Experimental Parasitology* **37**, 469-530.
- PAPPAS, P. W., UGLEM, G. L. & READ, C. P. (1973). *Taenia crassiceps*: absorption of hexoses and partial characterization of Na^+ -dependent glucose absorption by larvae. *Experimental Parasitology* **33**, 127-137.
- PIPER, R. C., XU, X., RUSSELL, D. G., LITTLE, B. M. & LANDFEAR, S. M. (1995). Differential targeting of two glucose transporters from *Leishmania enriettii* is mediated by an NH₂-terminal domain. *Journal of Cell Biology* **128**, 499-508.
- READ, C. P. & SIMMONS, J. E. JR. (1963). Biochemistry and physiology of tapeworms. *Physiological Reviews* **43**, 263-305.
- ROBERTS, L. S. (1983). Carbohydrate metabolism. In *Biology of the Eucestoda*. Vol. 2 (ed. Arme, C. & Pappas, P. W.), pp. 343-390. Academic Press, London.
- ROSEN, R. & UGLEM, G. L. (1988). Localization of facilitated diffusion and active glucose transport in cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *International Journal for Parasitology* **18**, 581-584.
- SANGER, F. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **74**, 5463-5465.
- SAUER, N. & TANNER, W. (1989). The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H^+ -cotransporter. *FEBS Letters* **259**, 43-46.

- SKELLY, P. J., KIM, J. W., CUNNINGHAM, J. & SHOEMAKER, C. B. (1994). Cloning, characterization and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 4247-4253.
- SKELLY, P. J. & SHOEMAKER, C. B. (1996). Rapid appearance and asymmetric distribution of glucose transporter SGTP4 at the apical surface of intramammalian-stage *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**, 3642-3646.
- SMYTH, J. D. (1994). *Introduction to Animal Parasitology*, 3rd Edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- STACK, S. P., STEIN, D. A. & LANDFEAR, S. M. (1990). Structural isoforms of a membrane transport protein from *Leishmania enriettii*. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 6785-6790.
- STADLER, R., WOLF, K., HILGARTH, C., TANNER, W. & SAUER, N. (1995). Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H⁺ symport. *Plant Physiology* **107**, 33-41.
- TETAUD, E., BRINGAUD, F., CHABAS, S., BARRETT, M. P. & BALTZ, T. (1994). Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**, 8278-8282.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **70**, 4354-4376.
- VON BRAND, T., McMAHON, P., GIBBS, E. & HIGGINS, H. (1964). Aerobic and anaerobic metabolism of larval and adult *Taenia taeniaeformis*. II. Hexose leakage and absorption; tissue glucose and polysaccharides. *Experimental Parasitology* **15**, 410-429.
- ZHONG, C., SKELLY, P. J., LEAFFER, D., COHN, R. G., CAULFIELD, J. P. & SHOEMAKER, C. B. (1995). 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.