



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

“Caracterización bioquímica de Trichialina like,
una proteína relacionada con filamentos intermedios en el parásito
Toxoplasma gondii”

Tesis que presenta

M. en C. Francisco Ernesto Sandoval Rodríguez

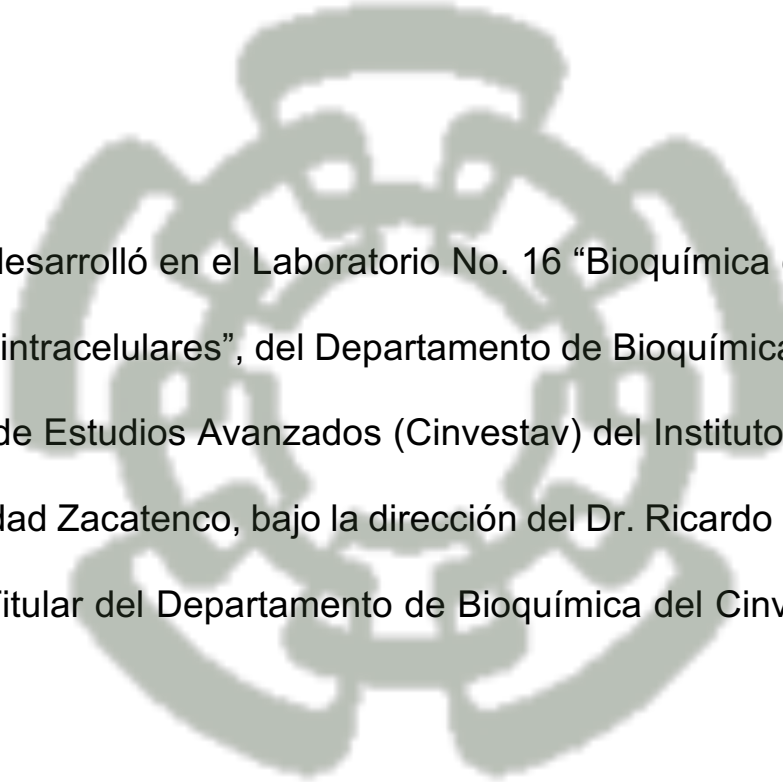
Para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Bioquímica

Director de la Tesis: Dr. Ricardo Mondragón Flores



El trabajo se desarrolló en el Laboratorio No. 16 “Bioquímica celular y molecular de patógenos intracelulares”, del Departamento de Bioquímica, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Ricardo Mondragón Flores, Investigador Titular del Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Zacatenco.

Agradecimientos

Al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** (Cinvestav-IPN), Unidad Zacatenco, por las facilidades para obtener el grado y el financiamiento otorgado.

Al **Dr. Ricardo Mondragón Flores** por aceptarme en su grupo de investigación, brindarme su asesoría y recomendaciones; destacando especialmente sus comentarios y tiempo para dirigir este proyecto.

A los miembros del Comité Tutorial: **Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega** (Bioquímica, Cinvestav-IPN), **Dr. Guillermo Ávila Flores** (Bioquímica, Cinvestav-IPN), **Dr. Juan Pedro Luna Arias** (Biología Celular, Cinvestav-IPN), **Dr. Javier Ambrosio Hernández** (Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México) por su tiempo y por sus muy valiosos comentarios a este trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (Conacyt) por la la beca brindada (CVU/Becario): 297768/227348, para realizar estudios en el programa de Doctorado en la Especialidad de Bioquímica en el Cinvestav-IPN.

Al apoyo proporcionado por el Fideicomiso: **Fondo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del CINVESTAV**. No 601410 FIDSC2018/51.

A la **Fundación Miguel Alemán A.C.** por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto.

A los profesores miembros del **Departamento de Bioquímica** del Cinvestav-IPN por su atención y críticas en los seminarios departamentales.

Al **personal administrativo del Departamento de Bioquímica** por las atenciones brindadas.

Al **Dr. Bulmaro Cisneros Vega**, del Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN, por su apoyo y facilidades para realizar los experimentos de biología molecular.

Al **Dr. Juan Pedro Luna Arias**, del Departamento de Biología Celular del Cinvestav-IPN, por su ayuda y puntuaciones en la parte bioinformática de esta tesis.

Al **Dr. Raúl Arguello García** del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav-IPN por su contribución para la determinación del docking de la tricohialina like.

A la **QFB Mónica Edith Mondragón Castelán** (auxiliar de investigación del Laboratorio No. 16 Departamento de Bioquímica Cinvestav-IPN), a **Carlos J. Ramírez Flores**, **Rosalba Cruz Mirón** y **Noé Lagunas Cortés** por su apoyo técnico en el desarrollo experimental de la presente tesis.

A la **QFB Sirenia González Pozos** (Unidad de Microscopia Electrónica, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE), Cinvestav-IPN, por su ayuda técnica en la parte de Microscopia Electrónica.

Al **QFB Pablo Gómez Islas** (auxiliar de investigación del Laboratorio Dr. Bulmaro Cisneros Vega, del Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN) por su asesoría técnica en biología molecular.

Al **M. en C. Emmanuel Ríos Castro** (Unidad Proteómica, LaNSE, Cinvestav-IPN) por su apoyo técnico y asesoría en el procesamiento de muestras en la parte de proteómica.

Al técnico **Ing. José Claudio Jiménez Vargas** por su amable y puntual atención en la preparación del material para la realización de esta tesis, así como los cuidados de los animales del laboratorio.

Al **Bioterio de la UPEAL** del Cinvestav-IPN por el mantenimiento y proporcionar los animales para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Dominique Soldati** y a la **Dra. Corinne Mercier** por los anticuerpos donados por la realización de este proyecto.

A la **Dra. Miriam Rodríguez Sosa** y al **Dr. Luís I. Terrazas Valdés** de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme asistir a su

curso avanzado intitulado “*Inmunología en Enfermedades Parasitarias*”, el cual forma parte del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

A **Cecilia Peña González**, por su apoyo y comprensión durante todos estos años.

A mis padres, **Alvaro Sandoval Quintero** y **Ma. Engracia Rodríguez Montoya**.

A mis hermanos: **Abia, Xochitl, Alvaro y Danae**.

A todos mis sobrinos.

A la familia **González Velázquez** por su cercanía durante estos años.

A mis compañeros del Laboratorio 16 “Patógenos intracelulares” , Bioquímica, Cinvestav-IPN: **Alexandra, Carlos, Carmen, Jessica, Kitzia, Noé, Rosalba, Rubén y Sandra**.

A mis compañeros de generación y amigos del Cinvestav-IPN, así como a los miembros del CEC (Comité Estudiantil del Cinvestav), a mis amigos del equipo Cinveswolves en especial a: **Ricardo Baltazar, José Manuel, Ricardo Ávila, Fátima, Rogelio, Karla Acosta, Lupita, César, Adrián, Erika, Mirelle, Adriana, Vicente, Nadia, Cristina, Mike, Orestes, Sonk, Alex, Fernando, Gelasio, Sergio y Ulises**.

A mis amigos de vida: **Alejandro, Dany, David, Alberto, Raquel, Felipe, Erika, Juan Luis, Pepe, Mony, Leslie, George, Michelle, Robert, Gaby, Alfonso, Homero, Copil, Nancy, Abraham, Claudia, Vania, Ramiro, Rafa, Alejandra Quijote, Nadia, Juan Carlos, Irma Monroy, Rober Antillón, , Alicia, Adán y Lourdes.**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. Introducción.....	3
2. Generalidades.....	4
2.1. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	4
2.2. Diferencias estructurales entre esporozoítos, taquizoítos y bradizoítos.....	7
2.3. Genoma de <i>T. gondii</i>	8
2.4. Poblaciones clonotípicas de <i>T. gondii</i>	9
2.5. Mecanismos de invasión celular de <i>T. gondii</i>	9
2.6. Citoesqueleto subpelicular de <i>T. gondii</i>	12
2.7. Tricohialina.....	15
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos.....	19
6. Estrategia Experimental.....	20
7. Materiales y Métodos.....	20
7.1. Análisis bioinformático de la tricohialina like.....	20
7.1.1. Determinación de los dominios de la tricohialina.....	20
7.1.2. Determinación de péptidos repetidos.....	20
7.1.3. Predicción de las interacciones de la tricohialina like.....	21
7.1.4. Análisis del dominio PTZ00121.....	21
7.2. Material biológico.....	22
7.2.1. Cultivo celular.....	22
7.2.2. Taquizoítos de <i>T. gondii</i> cepa RH.....	22
7.3. Obtención y mantenimiento de <i>T. gondii</i> cepa RH.....	22
7.4. Infección de células con taquizoítos de <i>T. gondii</i>	23

7.5. Anticuerpo anti-tricohialina like de <i>T. gondii</i>	23
7.6. Extracción de RNA total	25
7.7. Obtención de cDNA total	25
7.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
7.9. Electroforesis de productos de PCR en geles de agarosa.....	26
7.10. Purificación de amplicones para su secuenciación.....	26
7.11. Aislamiento del citoesqueleto subpelicular de <i>T. gondii</i>	26
7.12. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	27
7.13. Electroforesis en geles de poliacrilamida	27
7.14. Ensayo de Western blot (Wb)	27
7.15. Geles bidimensionales	28
7.16. Ensayo de inmunoprecipitación	29
7.17. Espectrometría de masas (MS).....	29
7.18. Ensayo de inmunofluorescencia	31
7.19. Microscopía electrónica de transmisión de citoesqueletos subpeliculares de <i>T. gondii</i>	31
7.20. Procesamiento de parásitos en resina LR-White y obtención de citoesqueletos para Inmunolectromicroscopía (IEM)	32
7.21. Detección de tricohialina por IEM en citoesqueletos subpeliculares y en cortes de muestras embebidas en resina LR-White	33
7.22. Inducción de filamentos <i>in vitro</i>	33
7.23. Efecto de fármacos sobre citoesqueleto de <i>T. gondii</i>	34
8. Resultados	35
8.1. Estudio bioinformático de las tricohialinas de <i>T. gondii</i>	35
8.2. Expresión transcripcional de las tricohialinas de <i>T. gondii</i>	44
8.3. Extractos de citoesqueletos subpeliculares	51
8.4. Validación de citoesqueletos subpeliculares por Western blot	52
8.5. Hallazgo de una nueva Red apical densa asociada al citoesqueleto subpelicular de <i>Toxoplasma</i> por microscopía electrónica de transmisión	53
8.6. Identificación y cuantificación de proteínas del citoesqueleto por espectrometría de masas	56
8.7. Identificación de la tricohialina like por inmunofluorescencia indirecta	58
8.8. Detección de la tricohialina like por Western blot.....	59
8.9. Análisis inmunoproteómico de tricohialina en geles de 2 dimensiones.	61

8.10. Detección ultraestructural de la tricohialina like en parásitos completos	63
8.11. Distribución de tricohialina en el citoesqueleto subpelicular de <i>T. gondii</i>	66
8.12. Inmunoprecipitación de la tricohialina like	68
8.13. Inducción de filamentos <i>in vitro</i>	75
9. Discusión	78
10. Conclusiones	89
11. Perspectivas	90
12. Bibliografía	91
13. U.R.L. (<i>Uniform Resource Locator</i>)	103
14. Anexos	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	5
Figura 2. Morfología del estadio esporozoíto, taquizoíto y bradizoíto.	7
Figura 3. Proceso de invasión activa.	12
Figura 4. Citoesqueleto de <i>T. gondii</i>	14
Figura 5. Características de la Tricohialina humana.....	16
Figura 6. Interactoma de la tricohialina humana (THH).	17
Figura 7. Estrategia experimental para la caracterización de la tricohialina like.	20
Figura 8. Diseño de péptidos inmunogénicos anti tricohialina like.	24
Figura 9. Localización y predicción de dominios de las tricohialinas putativas de <i>T. gondii</i> ...	37
Figura 10. Alineamiento local entre las tricohialinas de <i>T. gondii</i> con la THH.	39
Figura 11. Estructura tridimensional obtenida con I-TASSER de la tricohialina like de <i>T. gondii</i>	40
Figura 12. Plot de Ramachandran de la tricohialina like de <i>T. gondii</i>	41
Figura 13. Estructura cuaternaria de la tricohialina like de <i>T. gondii</i>	43
Figura 14. Expresión transcripcional de las tricohialinas putativas de <i>T. gondii</i>	45
Figura 15. Alineamiento múltiple con el programa MUSCLE empleando el dominio PTZ00121 de las tricohialinas en varios organismos.	49
Figura 16. Árboles filogenéticos de las tricohialinas de diferentes organismos.....	50
Figura 17. Patrón electroforético de extractos celulares durante la obtención del extracto de citoesqueletos subpeliculares de <i>T. gondii</i> de la cepa RH.	51
Figura 18. Validación por Western blot del aislamiento de la fracción enriquecida de citoesqueletos subpeliculares de <i>T. gondii</i>	52

Figura 19. Ultraestructura del citoesqueleto subpelicular de <i>T. gondii</i>	54
Figura 20. Detección de la Red apical densa (RdApDs) en cortes finos y por MET de taquizoítos extracelulares, en invasión celular y en ubicación intracelular.	55
Figura 21. Clasificación de las proteínas identificadas y cuantificadas a partir del citoesqueleto subpelicular de <i>T. gondii</i> cepa RH por espectrometría de masas.	57
Figura 22. Distribución de la tricohialina like por inmunofluorescencia indirecta.....	59
Figura 23. Identificación de la tricohialina like por electroforesis en SDS-PAGE y Western blot.	60
Figura 24. Electroforesis en gel bidimensional y Western blot.	62
Figura 25. Distribución de tricohialina mediante inmunoelectrónica (IEM) en cortes finos de taquizoítos extracelulares de <i>T. gondii</i>	65
Figura 26. Distribución de tricohialina en el citoesqueleto subpelicular de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	67
Figura 27. Clasificación de proteínas detectada por espectrometría de masas a partir de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-tricohialina.	69
Figura 28. Gel de inmunoprecipitado tenido con azul de Coomassie.....	70
Figura 29. Reconstitución de filamentos <i>in vitro</i> con extracto de citoesqueleto subpelicular e inmunooro con anti-tricohialin like.....	76
Figura 30. Detección de tricohialina like sobre citoesqueletos subpeliculares incubados en presencia de acrilamida, colchicina y citocalasina D.....	77
Figura 31. Esquema del citoesqueleto subpelicular de <i>T. gondii</i>	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar las tricohialinas de <i>T. gondii</i> .	26
Tabla 2. Identidad y similitud de tricohialina like con secuencias relacionadas a otras especies (BLAST).	45
Tabla 3. Datos de la identificación de la tricohialina like a partir de citoesqueletos de <i>T. gondii</i> cepa RH.	58
Tabla 4. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en el spot de 57 kDa del gel bidimensional y que correspondió con el spot inmunoreconocido con el anticuerpo anti-tricohialina.	62
Tabla 5. Proteínas relacionadas a filamentos intermedios detectadas en el inmunoprecipitado.	70
Tabla 6. Proteínas totales detectadas en el inmunoprecipitado.	71
Tabla 7. Aminoácidos evaluados para el gráfico de Ramachandran de la estructura tridimensional de la tricohialina like.	104
Tabla 8. Proteínas identificadas y cuantificadas por espectrometría de masas en el extracto de citoesqueleto subpeliclar de <i>T. gondii</i> cepa RH.	112

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIA	Adquisición independiente de datos
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium</i>
ESI	Ionización por <i>electrospray</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FA	Ácido fórmico
FDR	Tasa de falso de cobertura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEp-2	<i>Human Epithelial type 2</i>
IEDB	<i>Immune Epitope Data Base and Analysis Resource</i>
IEM	Inmunoelectromicroscopía
IFN- γ	Interferón gamma
IMC	Complejo membranal interno
IMS	Separación de movilidad iónica
LaNSE	Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales
mAb	Anticuerpo monoclonal
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MET	Microscopía electrónica de transmisión

MS	Espectrometría de masas
MTOC	Centro Organizador de Microtúbulos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAF	Paraformaldehído
PBS	Solución salina con buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RdApDs	Red apical densa
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris boratos-Ácido etilendiaminotetraacético
TBS-T	Tris base-Tween
THH	Tricohialina humana
TLCK	N- α -tosil-L-lisina clorometilcetona
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF α .	Factor de necrosis tumoral alfa
TPCK	N-tosil-L-fenilalanina clorometilcetona
ToxoDB	<i>Toxoplasma Data Base</i>
URL	<i>Uniform Resource Locator</i>
VP	Vacuola parasitófora
Wb	Western blot

RESUMEN

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito intracelular obligado de gran importancia médica y veterinaria. El citoesqueleto subpeliclar de *Toxoplasma* determina su forma y su alta capacidad motil y de invasividad de la célula hospedera. En éste y en otras coccidias, el conoide, un organelo apical altamente dinámico es proyectado sobre la membrana de la célula blanco durante la invasión. El extremo apical del parásito está sometido a grandes fuerzas tensoriales durante la invasión y la motilidad, por lo que la expresión de moléculas relacionadas a filamentos intermedios en esa zona sería necesaria para protección de la integridad durante la invasión. Recientemente nuestro grupo de investigación reportó el proteoma del citoesqueleto subpeliclar de taquizoítos de *T. gondii* cepa RH, formado por al menos 95 proteínas. Dentro de ellas se encontró a la tricohialina, una proteína relacionada a filamentos intermedios. En mamíferos, la tricohialina forma entrecruzamientos entre sí misma y con filamentos intermedios de queratina, para generar estructuras tipo red. Cabe destacar que hasta el momento no se han descrito filamentos intermedios y se desconoce la función de la tricohialina en *T. gondii* y en otros parásitos. En el presente trabajo, se hizo una caracterización bioinformática detallada de la tricohialina en *Toxoplasma*. Adicionalmente, se utilizó un anticuerpo comercial anti-tricohialina de mamífero y se diseñó un péptido para inmunizar ratones con la finalidad de obtener un anticuerpo policlonal. Con la ayuda de los anticuerpos anti-tricohialina, una tricohialina like se caracterizó y fue identificada a partir de extractos de citoesqueletos. Adicionalmente, mediante inmunofluorescencia, se encontró una distribución confinada al extremo apical del parásito que no se modifica durante la invasión y proliferación. Por inmunoelectromicroscopía se detectó la organización de la tricohialina en citoesqueletos aislados en forma de una red electrodensa ubicada por debajo del centro organizador de microtúbulos a nivel apical, así como en el conoide mismo. Por Western blot y en extractos de citoesqueletos, se detectaron 2 bandas de 57 y 90 kDa. Las proteínas de las bandas detectadas por Western blot se extrajeron, se incubaron *in vitro* y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión, observándose la presencia de redes similares a la red apical densa encontrada en el citoesqueleto subpeliclar. Las redes generadas *in vitro*, fueron reconocidas por el Ac anti tricohialina y oro coloidal. Se identificaron por espectrometría de masas las proteínas inmunoprecipitadas que interaccionan con la tricohialina like.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is an obligate intracellular parasite of great medical and veterinary importance. The subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma* determines its shape and its high motile capacity and invasiveness of the host cell. In this and other coccidia, the conoid, an apical highly dynamic organelle is extended over the host plasma membrane during the invasion. The apical end of the parasite is subjected to great tensor forces during invasion and motility, so the expression of molecules related to intermediate filaments in that area would be necessary for integrity protection during invasion. Recently our research group reported the proteome of the subpellicular cytoskeleton of tachyzoites of *T. gondii* strain RH, consisting of at least 95 proteins. Within them, trichohyalin was found as a protein related to intermediate filaments. In mammals, trichohyalin forms crosslinks between itself and with intermediate keratin filaments, to generate network-like structures. It should be noted that so far, no intermediate filaments have been described in *Toxoplasma* and the function of trichohyalin in *T. gondii* and in other parasites is unknown. In the present work, a detailed bioinformatic characterization of trichohyalin in *Toxoplasma* was made. Furthermore, a commercial mammalian anti-trichohyalin antibody was used and a peptide was designed that was used to immunize mice and rabbits in order to obtain the respective polyclonal antibodies. With the help of anti-trichohyalin antibodies, a trichohyalin like was identified and characterized from cytoskeleton extracts. Additionally, by immunofluorescence, a distribution confined to the apical end of the parasite was found that was not modified during invasion and proliferation. By immunoelectromicroscopy, organization of trichohyalin like was detected as part of an electrodense network located below the microtubule organizing center at the apical level and in the conoid itself. By Western blot, 2 bands of 57 and 90 kDa were detected in cytoskeleton extracts. The proteins of the bands detected by Western blot were extracted, incubated *in vitro* and observed by transmission electron microscopy as networks similar to the electrodense apical network found in the subpellicular cytoskeleton. The networks generated *in vitro* were recognized by the antibody against trichohyalin and colloidal gold. Immunoprecipitated proteins that interact with trichohyalin like were identified by mass spectrometry.

1. Introducción

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito intracelular obligado con distribución cosmopolita, y es el agente causal de la Toxoplasmosis. Estudios epidemiológicos de la Organización Mundial de la Salud reportaron que más de una tercera parte de la población mundial presenta infección latente por *T. gondii* (URL 1). La toxoplasmosis está clasificada como una de las cinco enfermedades parasitarias desatendidas de acuerdo con el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos (URL 2).

T. gondii pertenece al *phylum Apicomplexa*, del cual forman parte otros parásitos patógenos al humano y animales (Francia & Striepen, 2014), tales como *Sarcocystis spp.* (Sarcocistiosis), *Plasmodium spp.* (Malaria), *Cryptosporidium spp.* (Criptosporidiosis) y *Eimeria spp.* (Coccidiosis, en aves de corral). Nicholle y Manceaux (1908) fueron los primeros en describir a *T. gondii* en roedores *Ctecnodactylus gundi* provenientes del norte de África (Ferguson & David, 2009). En el mismo año, Splendore encontró los parásitos en conejos de Brasil (Ferguson & David, 2009). *T. gondii* se caracteriza por su elevada patogenicidad, ya que posee la capacidad de infectar a más de 3,000 especies de mamíferos, 30 de aves e incluso se ha aislado en animales acuáticos (Dubey et al., 2007; Mazzillo et al., 2013). Por otro lado, en 1920 la toxoplasmosis congénita fue de gran relevancia debido a los daños producidos a la población infantil, como son hidrocefalia, retinocoroiditis y encefalitis (Halonen & Weiss, 2014). Pero en los ochentas *T. gondii* emergió notablemente como una de las principales enfermedades infecciosas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA. Durante la fase de inmunosupresión por VIH, el parásito sufre una reactivación de la infección latente presentando una encefalitis severa y potencialmente mortal. También, la reactivación se presenta en pacientes con tratamiento de cáncer o trasplante de órganos, es decir, en enfermos inmunosuprimidos. Sin embargo, en individuos inmunocompetentes infectados con *T. gondii* se ha asociado la infección latente a trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia, debido a tropismo del parásito por el cerebro y un posible daño neuronal (Vyas et al., 2007; Flegr, Groer & Beckie., 2014; Hsu et al., 2014). En mujeres embarazadas el parásito puede atravesar la barrera placentaria ocasionado aborto o hidrocefalia, dependiendo de la fase de la gestación (Jones, Lopez & Wilson., 2003).

2. Generalidades

2.1. Ciclo de vida de *T. gondii*

El ciclo de vida de *T. gondii* se compone por diversos estadios y fases de proliferación (Figura 1). Intervienen hospederos intermediarios y hospederos definitivos, todos ellos homeotermos. El felino es el hospedero definitivo, en donde ocurre la fase de reproducción sexual. Entre los hospederos intermediarios, donde ocurre la fase asexual de reproducción, se pueden mencionar al ser humano, ganado bovino, porcino, aves, roedores, entre otros. El ciclo de vida del parásito inicia cuando un felino consume una presa infectada con quistes tisulares de *T. gondii*. Como resultado del proceso digestivo, se liberan los bradizoítos de los quistes tisulares, los cuales invaden el epitelio intestinal de los felinos y se induce la diferenciación del estadio bradizoíto a macrogametocito, que es la forma masculina flagelada del parásito y que fertiliza a la forma femenina denominada macrogametocito, ubicada a nivel intracelular en los enterocitos. A este fenómeno de fertilización se le llama gametogonia (Cornelissen & Overdulve, 1985). El resultado de esta fusión es una estructura denominada ooquiste. Los ooquistes inmaduros son secretados en las heces de los felinos al medio ambiente. Después de una semana bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas, los ooquistes maduran formando en su interior 8 esporozoítos altamente infectivos. Los diversos hospederos se infectan al ingerir ooquistes maduros presentes en alimentos preparados con poca higiene o por el consumo de verduras y agua contaminadas, representado una forma de transmisión de la toxoplasmosis (Hutchison, 1965; Dubey & Frenkel, 1976).

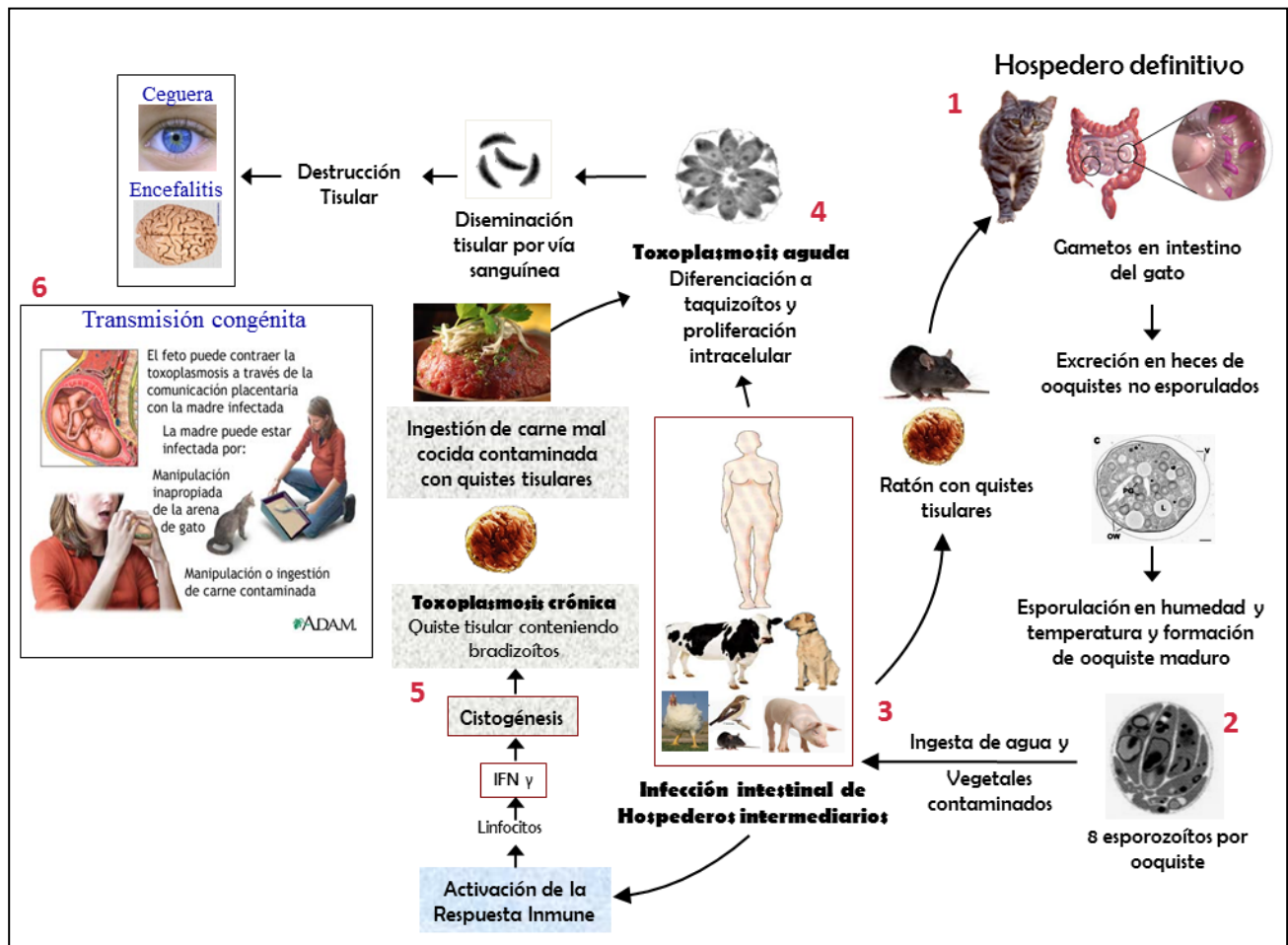


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii*. 1. Los felinos, como el gato doméstico, son los hospederos definitivos en donde ocurre la gametogonia y se producen oocistos. A través de las heces de los felinos se excretan los oocistos no esporulados al medio ambiente, contaminando hortalizas, agua y alimentos. 2. Una vez en el medio ambiente los oocistos esporulan formando 8 esporozoítos infectivos. 3. Los oocistos maduros son consumidos por hospederos intermediarios. 4. Los esporozoítos salen del oocisto a nivel intestinal e invaden el epitelio intestinal, en donde se diferencian a taquizoítos. Los taquizoítos son las formas del parásito más dinámicas y patógenas, pues son los responsables de la invasión y la forma de mayor proliferación. Asimismo, generan la toxoplasmosis aguda, y se localizan en diversos órganos. 5. La toxoplasmosis crónica se presenta cuando el sistema inmune del hospedero se activa con participación de linfocitos CD8+ y la secreción de interleucinas como el INF- γ , ocasionando el enquistamiento del parásito y diferenciación de los taquizoítos a bradizoítos, generando así una infección latente. Los quistes son resistentes a fármacos y al sistema inmune. En pacientes inmunocomprometidos puede ocasionar ceguera o encefalitis. 6. En mujeres embarazadas, la infección en el primer trimestre de gestación puede ocasionar abortos espontáneos, ya que los taquizoítos poseen la capacidad de atravesar la placenta e infectar al feto. El producto puede sobrevivir si la infección es en el segundo o tercer trimestre del embarazo, aunque puede nacer con ceguera y malformaciones. Modificado de Sandoval & Mondragón (2017).

Una vez consumidos los ooquistes, ya sea por el hospedero intermediario o definitivo (por autoinfección), se liberan los esporozoítos por acción enzimática y el pH intestinal para invadir de inmediato a los enterocitos. Los esporozoítos miden 2 μm de ancho y 6-8 μm de largo, se caracterizan por un núcleo subterminal (Figura 2) y resisten el pH ácido y la acción de enzimas proteolíticas como tripsina (Makioka, Susuki & Kobayashi., 1991). Durante la invasión por los esporozoítos se forma una vacuola tipo endocítica en donde se aloja el parásito. A esta vacuola se le conoce como vacuola parasitófora (VP) (Nichols & O'Connor, 1981). En el interior de la VP, los esporozoítos intracelulares se diferencian a taquizoítos (Schwartzman & Saffer, 1992), los cuales, se reproducen exponencialmente por endodiogenia. Ésta es una división asexual, en la cual a partir de una célula madre se generan en su interior dos células hijas, lo cual ocurre en un estimado de 7 h (Radke & White, 1998; Filisetti & Candolfi, 2004). Los taquizoítos, que son responsables de la diseminación y destrucción tisular, son considerados la forma más activa y dinámica respecto a los otros zoítos (Frenkel, 1973; Mondragon, et al., 1998; Khan & Grigg, 2017). Tienen forma de arco o media luna y miden 3 μm de ancho por 6 μm de largo, con un extremo anterior puntiagudo y redondeado en el extremo posterior (Figura 2). Por la presencia del parásito, y muy probablemente por moléculas secretadas, se activa el sistema inmune. Esta activación produce anticuerpos no protectores, así como la secreción de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). El IFN- γ , sinérgicamente con TNF α , induce la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto y con la transformación de la VP a quiste tisular (Bohne, Heesemann & Gross., 1994). Los bradizoítos son el estadio de lenta replicación y baja motilidad, miden 1.5 μm de ancho y 7.0 μm de largo (Figura 2). Durante la diferenciación, la VP se transforma en un quiste tisular por procesos moleculares y biológicos desconocidos, a esto se le conoce como cistogénesis. Los quistes tisulares son los responsables de resguardar a los bradizoítos y pueden permanecer por un largo tiempo en prácticamente todos los órganos aunque en mayor proporción en músculo, corazón, ojo y cerebro, y así ser fuentes de transmisión de la enfermedad, al ser consumidos por otros hospederos (Katris et al., 2014). La ingesta de carne mal cocida o cruda es una ruta de transmisión de la Toxoplasmosis. En pacientes inmunocomprometidos y en mujeres embarazadas previamente infectadas, los bradizoítos se reactivan y salen del quiste para de inmediato invadir a las células circunvecinas y posteriormente distribuirse a todo el organismo, así como, atravesar

la placenta para afectar al feto en el caso de una mujer embarazada. Una vez dentro de la VP, los bradizoítos se diferencian a taquizoítos, los cuales se diseminan por todo el organismo. En el caso de mujeres embarazadas puede ocasionar daños irreversibles al producto e incluso inducir aborto. La gravedad del daño sobre el producto depende de la etapa de la gestación en el cual ocurre la infección (Jones, Lopez & Wilson., 2003).

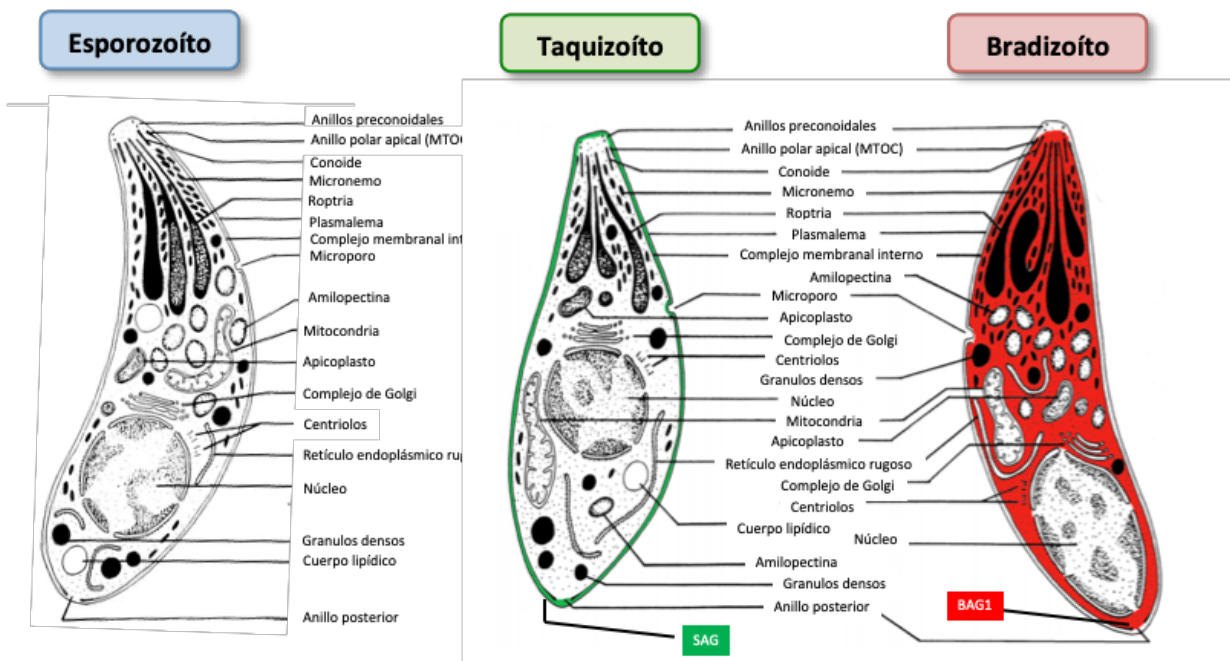


Figura 2. Morfología del estadio esporozoíto, taquizoíto y bradizoíto. La forma y distribución de organelos es similar en las tres formas parasitarias de *Toxoplasma*, aunque con algunas diferencias estructurales y de expresión de proteínas. El taquizoíto en el centro expresa la proteína SAG-1 (verde) en toda la membrana del parásito, y de lado derecho el bradizoíto expresa la proteína citosólica BAG1 (rojo). Modificado de Dubey et al., 1998.

2.2. Diferencias estructurales entre esporozoítos, taquizoítos y bradizoítos

Los esporozoítos, taquizoítos y bradizoítos de *T. gondii* son similares ultraestructuralmente, pero difieren en ciertos organelos y cuerpos de inclusión (Figura 2) (Dubey et al., 1998). Los taquizoítos contienen pocos micronemos (pequeños organelos vesiculares) que contienen a las proteínas MIC; en esporozoítos hay una cantidad intermedia, y en bradizoítos una mayor cantidad. Los gránulos densos que alojan a las proteínas GRA (cuerpos esferoidales localizados en la parte posterior y media) son más numerosos en esporozoítos y taquizoítos, que en bradizoítos. Además, los tres tipos de zoítos contienen un número similar de roptrias (8 roptrias, organelos con forma de bolsa alargada, localizada en la parte anterior o apical de los

parásitos). Sin embargo, la forma de las roptrias difiere en apariencia entre los zoítos. En taquizoítos las roptrias tienen una forma alargada, cuyo cuello más delgado está insertado al interior del conoide y es electrodensa, mientras que su extremo posterior es redondeado y con cuerpos vesiculares en su interior. En esporozoítos suelen contener roptrias vesiculadas y electrodensas. En bradizoítos por lo general contienen roptrias electrodensas, algunas de las cuales se doblan sobre sí mismas (Figura 2). La presencia de gránulos de amilopectina son numerosos y relativamente grande en esporozoítos y bradizoítos, pero son pocos y pequeños, o incluso ausentes, en taquizoítos (Ferguson & Hutchison, 1987; Dubey et al., 1997; Dubey, 1998; Bradley et al., 2005). Por último, los cuerpos lipídicos están ausentes en el bradizoíto, pero presentes en esporozoítos y ocasionalmente en taquizoítos (Dubey et al., 1998).

2.3. Genoma de *T. gondii*

Toxoplasma posee un genoma haploide con un tamaño de ~63 Mb y se compone de 14 cromosomas (Gajria et al., 2008). Desde el 2013 está disponible la versión 9.0 de la base datos y plataforma ToxoDB del genoma completo de *T. gondii* de la cepa ME49 (Dalmasso et al., 2014). En ToxoDB se cuenta con las secuencias de genes, transcritos y proteínas de cepas representativas como GT1, ME49 y VEG, así como de otros organismos del *Phylum* Apicomplexa (Gajria et al., 2008). En esta base datos es posible conocer la localización de un gen en un cromosoma. Hay disponibles proyectos para otros *Apicomplexa* en la página web ApiESTDB (<http://www.cbil.upenn.edu/paradbs-servlet/>). Actualmente *T. gondii* tiene más de 60,000 ESTs que han sido secuenciadas a partir de diferentes etapas del ciclo de vida y los tres genotipos principales (Ajioka et al., 1998; Li et al., 2004; Aurrecoechea et al., 2007). La información sobre polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), así como la secuencia de cDNA está presente para genes altamente expresados. De acuerdo con Gajria y colaboradores se han identificado 8032 genes que codifican a proteína. Por lo tanto, los análisis *in silico* de la expresión de proteínas y su verificación experimental, ha facilitado el desarrollo de algoritmos para la predicción de sitios de iniciación de traducción y uniones intrón-exón, empleados para la predicción de genes.

2.4. Poblaciones clonotípicas de *T. gondii*

Toxoplasma se ha clasificado en tres poblaciones clonotípicas: tipo I, II y III, a partir de aislados en América del Norte y Europa, con base en su DNA genómico. Estos se caracterizan por el tipo de hospedero que invade, grado de virulencia en ratones y por su capacidad de formar quistes (Howe & Sibley, 1995). Las cepas de *T. gondii* se diferencian también por su tasa de invasión y crecimiento (Kaufman & Maloney, 1962; Appleford & Smith, 1997). Los análisis indican que estos linajes clonales surgieron después de un solo cruce genético y su rápida expansión como producto de la adquisición de la infectividad oral directa (Su, 2003). Se estima que este cruce genético ocurrió hace aproximadamente 10 mil años, coincidiendo con el establecimiento de la agricultura y la domesticación de animales como el gato (Fux et al., 2007). En el genotipo I se encuentra la cepa RH, la cual es considerada de virulencia elevada con una letalidad del 100% (LD₁₀₀) al infectarse ratones con un solo parásito. Adicionalmente presenta una elevada motilidad *in vitro* y una rápida diseminación *in vivo*, y por ello es considerada como una cepa no formadora de quistes. En el genotipo II como las cepas 76K y ME49, se caracterizan por su virulencia intermedia e inducen una fuerte respuesta proinflamatoria. Finalmente, en el genotipo III están las cepas NED, y VEG, las cuales causan el 50% de letalidad, con aproximadamente 10⁶ parásitos, y por ello se consideran de muy baja virulencia. Las líneas clonales difieren entre sí en sólo 1-2% en su secuencia nucleotídica (Fux et al., 2007; Sibley & Boothroyd., 1992, Sibley, 2009). En América del Sur se han aislado cepas del tipo I, las cuales son responsables de infecciones oculares en humanos (Vallochi et al., 2008). Las cepas II y III son formadoras de quistes y han sido aisladas de pacientes con infección congénita y con SIDA, además de ser frecuentemente aislados en animales (Howe & Sibley, 1995; Mondragon et al., 1998).

2.5. Mecanismos de invasión celular de *T. gondii*

T. gondii posee la capacidad de infectar a todas las células nucleadas, incluyendo dendríticas y macrófagos (Dubey, 2009, 2008). Por ello requiere de estrategias para invadir, replicarse y exteriorizarse. Se han descrito dos tipos de invasión: la pasiva y la activa, y se caracterizan en función del tipo de célula hospedera que infectan. En la invasión pasiva el parásito infecta exclusivamente células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, en un

tiempo estimado de 2-15 min. En tanto que en células que sólo realizan endocitosis, el parásito penetra por invasión activa, en un periodo de 25-40 s (Morisaki, Heuser & Sibley., 1995). Durante la invasión pasiva del parásito en células fagocíticas, se forma extensiones o filopodios de la membrana, se fosforilan proteínas en residuos de tirosina y en el citoesqueleto se reorganizan los microfilamentos de actina, todos ellos eventos característicos de la fagocitosis mediada por receptor (Greenberg, Chang, Silverstein., 1993). Las posibles moléculas que actúan como aceptor en el hospedero se conocen parcialmente; una de ellas es laminina, un componente de matriz extracelular (Kasper & Mineo, 1994). El parásito es engullido en un fagosoma, el cual para el caso de *T. gondii* es no fusogénico, ya que este fagosoma no posee señales de reconocimiento ni de fusión con lisosomas de la célula fagocítica (Jones & Hirsch, 1972; Morisaki et al., 1995). Por otro lado, se ha propuesto que el parásito secreta componentes proteicos y lípidos que transforman el fagosoma en una VP no fusogénica ya que no expresa moléculas de fusión a lisosomas (Dubremetz, 1998).

En la invasión activa se presentan dos fenómenos fisiológicos en el parásito, uno es la secreción de proteínas provenientes de organelos secretores del parásito y por un movimiento denominado *gliding* (deslizamiento), característico de los *Apicomplexa* (Figura 3). El inicio de la invasión activa es la secreción de componentes de los micronemos por activación del parásito. Hasta el momento se desconoce la molécula inductora de la secreción (Kessler et al., 2008). Los micronemos secretan a un grupo de proteínas denominadas MIC que funcionan sobre el parásito como moléculas de adhesión y lubricante, permitiendo al parásito deslizarse sobre la membrana de la célula hospedero. A continuación, el parásito detecta una zona en donde se detiene y se ancla en la membrana. De ahí se produce la llamada “extrusión del conoide”, en donde el conoide es un organelo retráctil con forma de cono truncado ubicado en el extremo apical del parásito y que posee la capacidad de retraerse o extenderse a manera de estilete sobre la membrana de la célula blanco previo a la internalización celular (Mondragon & Frixione, 1996). Una vez extruido el conoide, el parásito se ancla en una zona definida en donde la membrana plasmática de la zona apical se fusiona con la membrana de la célula blanco formando una unión estable y móvil a medida que el parásito se internaliza. La fusión de las membranas de la célula hospedero con la del parásito ocurre a través de proteínas secretadas desde los micronemos (Nichols & O’Connor, 1981; Nichols, Chiappino & O’Connor., 1983; Del Carmen et al., 2009). Después de la fusión de las membranas, el parásito secreta el contenido

de las roptrias generándose una horadación en la membrana de menos de una micra con la internalización del parásito mediante movimientos tipo tornillo y la formación de una vacuola endocítica que envuelve al parásito a través de una unión de sellada móvil que culmina con la formación de una VP que contiene al parásito y que se separa de la membrana plasmática. El desplazamiento sobre el sustrato o sobre la membrana de la célula blanco por *T. gondii* y otros parásitos *Apicomplexa*, se lleva a cabo por *twirling-gliding* o deslizamiento con movimientos rotativos. Esto ocurre porque el parásito no cuenta con organelos de locomoción como cilios, flagelos o una membrana ondulante como en las amibas (King, 1988). El movimiento tipo *gliding* es proporcionado por un complejo proteico conocido como glideosoma, el cual consiste en un deslizamiento hacia delante en el sentido contrario de las manecillas del reloj a manera de una cinta transportadora continua de proteínas adhesivas adjuntas que son translocadas hacia el extremo posterior y sobre el sustrato con liberación de componentes de membrana, los cuales son detectados como huellas de locomoción (Song & Springer, 2014). El movimiento a través del complejo adhesina-sustrato es realizado por un motor de miosina dependiente de actina en el interior de la membrana plasmática del parásito (Sibley, 2004). La fuerza motriz del *gliding* impulsa al parásito hacia adelante 1-2 $\mu\text{m/s}$ (Håkansson et al., 1999) y proporciona la fuerza durante la invasión de células, exteriorización y migración a través de barreras celulares (Barragan & Sibley, 2002, 2003). En experimentos donde se empleó citocalasina D, un despolimerizador de filamentos de actina, se encontró un bloqueo del movimiento tipo *gliding*, así como una disminución en la entrada de *T. gondii* sobre la célula hospedera (Ryning & Remington, 1978). En estudios genéticos moleculares se mostró que los filamentos de actina del parásito son esenciales para la invasión de la célula hospedera (Dobrowolski & Sibley, 1996). Por el contrario, no hay cambios perceptibles en el citoesqueleto durante la invasión. Además, se demostró que el citoesqueleto del hospedero parece no ser esencial para el proceso de entrada (Morisaki et al., 1995). Una vez dentro de la VP, el parásito inicia la secreción del contenido de los gránulos densos para formar la red vesículo-tubular intravacuolar y modificar la topografía molecular de la membrana de la VP. Ahí mismo, el parásito prolifera mediante endodiogenia, un proceso asexual en el cual una célula madre forma en su interior en dos parásitos hijos. La saturación del espacio intravacuolar con taquizoítos y su posterior salida destruye a la célula invadida, y los parásitos libres inician de inmediato la invasión de las células vecinas alcanzando diversos órganos.

Ciclo lítico de *Toxoplasma gondii*



Figura 3. Proceso de invasión activa. El primer paso de la invasión es la adhesión del parásito a la membrana de la célula hospedera. Después el parásito se desliza a través de la membrana. En un sitio específico se extruye el conoide y se internaliza por medio de un movimiento tipo tornillo. En la invasión se secretan las proteínas provenientes de organelos secretores como son los micronemos, roptrias y gránulos densos. Las proteínas MIC y ROP son secretadas desde micronemos y las roptrias, respectivamente. El parásito se replica por endodiogenia dentro de la célula hospedera en una VP. Por último, el parásito se exterioriza y destruye la célula hospedera para infectar a otra célula. Modificado de Díaz, R. & Mondragón F. (2017).

2.6. Citoesqueleto subpelicular de *T. gondii*

Los parásitos Apicomplexas se caracterizan por su morfología y posición de los organelos en cada estadio y por la región especializada en la parte apical, proporcionada por su citoesqueleto subpelicular (Morrissette, Naomi & Sibley, 2002; Gubbels et al., 2008). En la invasión, replicación y exteriorización, el parásito remodela su citoesqueleto, el cual es esencial para que mantenga su forma durante estos eventos (Carruthers & Sibley, 1997; Carruthers, Giddings & Sibley., 1999), sin deformarse ni dañar a otros organelos. El citoesqueleto de *T. gondii* mantiene su estabilidad bajo las siguientes condiciones: altas presiones, frío y ante el tratamiento con detergentes fuertes como el tritón X-100, el cual se emplea normalmente para aislarlo (Morrissette, Murray, & Roos, 1997; Patrón et al., 2005). *Toxoplasma* tiene un citoesqueleto

leto subpelicular que desde el extremo anterior (Figura 4), también denominado complejo apical, se compone por dos anillos preconoidales, el conoide y por un anillo polar apical que funge como centro organizador de microtúbulos (MTOC por sus siglas en inglés), donde se anclan un conjunto de 22 microtúbulos subpeliculares que se extienden hasta tres cuartas partes del cuerpo del parásito; una red subpelicular que rodea al parásito y se distribuye desde el MTOC hasta el anillo polar posterior (Morrissette et al., 1997). El citoesqueleto subpelicular se compone por dos complejos: uno en el extremo anterior (complejo apical) y otro en el posterior (complejo basal) (Anderson-White et al., 2012). La forma de media luna y la fuerza motriz es proporcionada por los microtúbulos subpeliculares y una red submembranal de filamentos (Patrón et al., 2005). La superficie del parásito es rodeada por una estructura trimembranal conocida como películo, la cual está constituida por la membrana plasmática y por el complejo membranal interno (IMC) (Foussard et al., 1990). El películo está íntimamente unido a una gran cantidad de elementos del citoesqueleto como actina, miosina y una red de proteínas filamentosas de naturaleza desconocida (Figura 4). A la fecha se desconoce de la presencia de filamentos intermedios en *T. gondii*. El películo se asocia a estas proteínas formando un complejo multiproteico conocido como glideosoma (Keeley & Soldati, 2004). Se ha propuesto que la mayor parte de la actina se encuentra en forma globular, y esta se reorganiza en filamentos cuando se requiere activar la motilidad del parásito (Patrón et al., 2005). Cuando los microfilamentos se tratan con jasplakinolida, un fármaco inductor de la polimerización de actina, se detecta una cantidad exacerbada de actina F principalmente a nivel apical (>98%) (Dobrowolski, Niesman & Sibley., 1997).

En la parte apical se localizan los 22 microtúbulos subpeliculares que están organizados desde el MTOC el cual está ubicado debajo del conoide. El conoide es un organelo retráctil en forma de cono truncado que está compuesto por subunidades filamentosas distribuidas de forma helicoidal en el sentido de las manecillas del reloj (Nichols & Chiappino, 1987). Al interior del conoide hay dos microtúbulos cortos pareados unidos entre sí. Entre las proteínas que constituyen el conoide se puede mencionar la α -tubulina. Durante la invasión se produce la extrusión del conoide, un evento dinámico contráctil que puede inducirse *in vitro* por ionóforos del calcio como la ionomicina y A23187, en tanto su inhibición se produce al tratar al parásito con cito-calasina D o por la quelación de calcio citosólico con BAPTA-AM (Mondragon & Frixione, 1996; Del Carmen et al., 2009). La motilidad y la invasión dependen de un motor de miosina; en *T.*

gondii se han descrito cinco clases de miosinas de tipo XIV: TgM-A, TgM-B, TgM-C, TgM-D y TgM-E, las cuales se encuentran conservadas entre los Apicomplexas (Heintzelman & Schwartzman, 1997, 1999, 2001; Hettmann et al., 2000). Los Apicomplexas cuentan con estructuras conocidas como placas alveolares, las cuales están compuestas por proteínas y forman parte del citoesqueleto subpelicular, además de estar asociadas al IMC. Dichas estructuras que son la base del películo, ya que integran un andamio durante la replicación y sirven como soporte para el glideosoma (Mann & Beckers, 2001; Gaskins et al., 2004). Entre las proteínas encontradas en las placas alveolares se pueden mencionar las alveolinas y las de tipo Articulina, las cuales poseen motivos repetitivos "alveolina". Al conjunto de alveolinas de *T. gondii* se les conoce como proteínas IMC (Mann & Beckers, 2001; Anderson-White et al., 2011; Gómez de León et al., 2014). La caracterización de la función de los componentes del citoesqueleto ha sido realizada por medio de fármacos o mediante el *knock out* de ciertos genes. Por otro lado, se ha logrado obtener su localización por microscopía con anticuerpos monoclonales y policlonales (Fréchal et al., 2017).

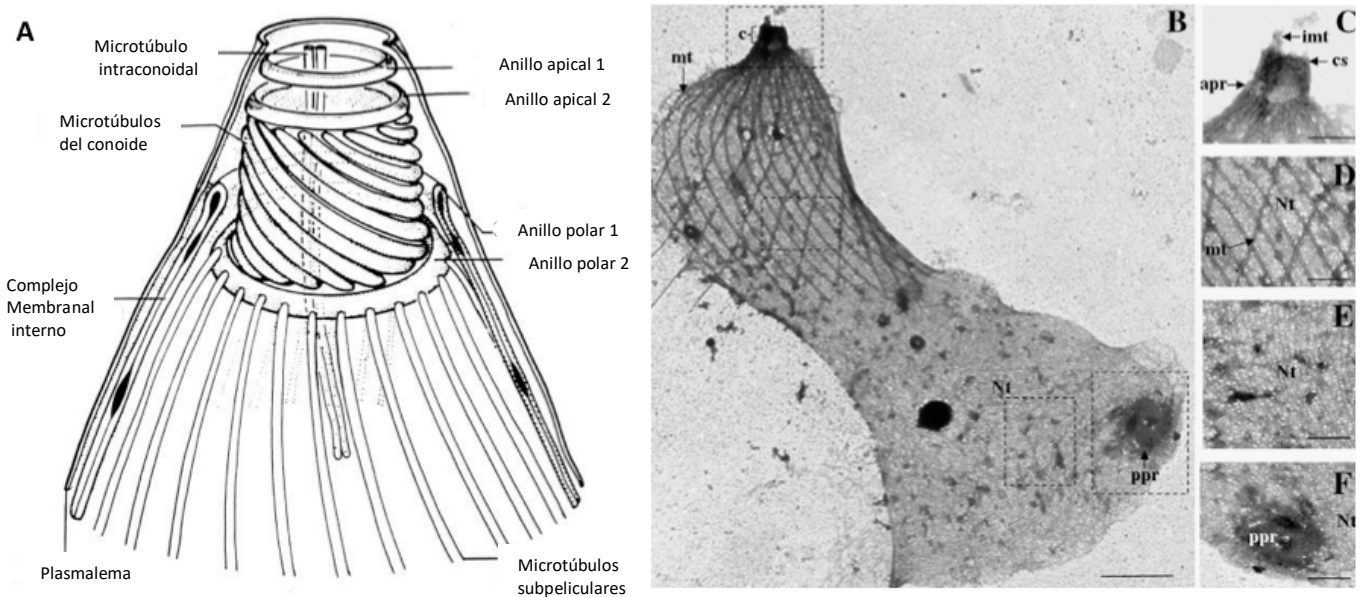


Figura 4. Citoesqueleto de *T. gondii*. A. Representación esquemática del complejo apical. B. Citoesqueleto subpelicular de taquizoíto de *T. gondii* c, conoide; mt, microtúbulos subpeliculares; Nt, red subpelicular; ppr, anillo polar posterior; barra=1 μ m. C–F. Amplificación de las zonas indicadas en el panel B. C. Extremo apical; imt, microtúbulo intraconoidal; cs, subunidad conoidal; apr, anillo polar apical. D. Debajo del anillo polar apical; mt, microtúbulo subpelicular;

Nt, red. E. Red subpelicular, Nt: red. F. Anillo polar posterior asociado a la red; barra = 0.5 μm . Panel A modificado de Dubey et al., 1998, panel B-F tomado de Gómez de León et al. 2014.

En el trabajo de Gómez de León y colaboradores en el 2014, se aisló y caracterizó el citoesqueleto subpelicular de *T. gondii* en el estadio taquizoíto de la cepa RH. El patrón electroforético unidimensional se analizó mediante espectrometría de masas. En este trabajo se identificaron 95 proteínas, algunas de las cuales fueron reportadas con anterioridad, algunas de ellas con función desconocida al citoesqueleto subpelicular, entre ellas, una proteína relacionada a filamentos intermedios denominada tricohialina putativa, que hasta el momento no se ha descrito su función ni localización en este parásito. En otros parásitos y en plantas no se ha descrito la presencia de filamentos intermedios ni otras proteínas relacionadas a estos.

2.7. Tricohialina

La tricohialina humana (THH) es una proteína relacionada con filamentos intermedios, la cual se expresa en células especializadas y mecánicamente fuertes, tales como las células de la vaina de la raíz interna del folículo piloso. Se une fuertemente a filamentos intermedios como la queratina y es similar a involucrina, un componente de la envoltura celular y se ha propuesto que juntas podrían servir como proteínas de andamiaje (Lee et al., 1993a). La THH posee la capacidad de formar redes entre ella misma y con la queratina. Para que se lleve a cabo la unión con la queratina y forme una red (Figura 5), la THH sufre modificaciones en su estructura por medio de la enzima arginina peptidil deaminasa (PAD), en donde residuos arginina por desaminación producen residuos de citrulina. La THH es una proteína conservada en otros mamíferos como ratones, ovejas y cerdos, en donde se ha detectado por Western blot con un peso aproximado de 200 kDa, y se compone mayoritariamente por residuos de aminoácidos con carga. La THH se compone por dominios basados en regiones de regularidad de secuencia alta o baja, entre repeticiones adyacentes como sigue: el dominio 1 está compuesto desde el residuo 1-94 con dos dominios de unión a calcio manos-EF bien definidos; el dominio 2, compuesto por los residuos 95-312 en cuya secuencia no hay elementos repetitivos organizados y en gran parte esta constituido por α -hélices; el dominio 3 se compone por dos regiones con dos distintos repetidos, de los residuos 313-389 se localizan 13 residuos RREQEEERRE-QLL, del 390-443 se compone por RREQQL, ambas regiones se estabilizan por α -hélices; el

dominio 4 de los residuos 444-702 se compone por 28 residuos con la secuencia LKRE-QEERREQRLKREEEEREQERREQR o (REQRLKRE(E/Q)EER)₂EQER, estabilizado por α -hélice; el dominio 5 los residuos 703-922 muestra una posible regularidad alrededor de residuos W(QEQARERIKSRIPWQWQLESEADAR), contiene α -hélice, pero también hojas- β plagadas; el dominio 6 (residuos 923-1163), está compuesto por la repetición de 30 residuos altamente regulares (QEEEQLLREEREKRRRQERERQYR(E/K)EEELQ), estabilizada por α -hélice; el dominio 7 (residuos 1164-1249) sin aparente regularidad, contiene una α -hélice, pero también varias vueltas, el dominio 8 (residuos 1250-1849) está compuesto por repetidos bien definidos pero con un consenso irregular de 26 residuos, y varios más cortos (RQER-DRKFREEEQQLRRQEREEQQLR) o (EEQQLRRQER)₂DRKFRE), con el elemento más común de RQERDRKFREEEQ; α -hélice altamente estabilizada, el dominio 9 (residuos 1850-1897) no presenta repeticiones, lo cual probablemente presente plegamientos o estructuras globulares debido a un giro frecuente (Lee et al., 1993b).

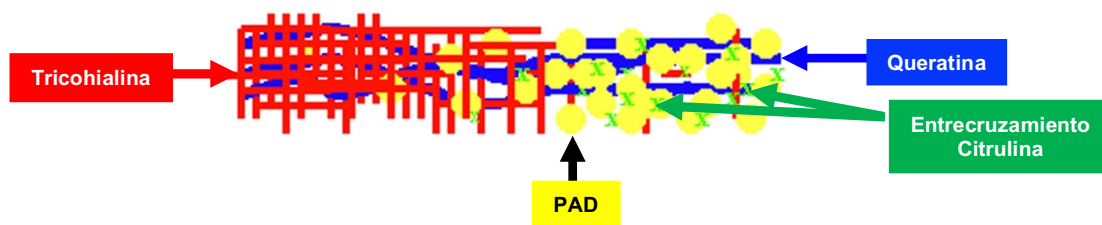
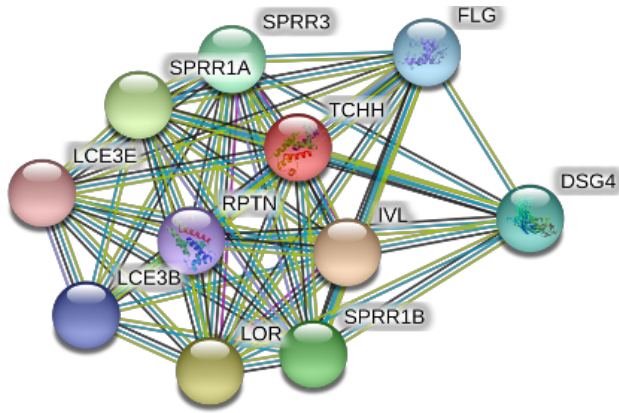


Figura 5. Características de la Trichialina humana. Representación esquemática de la formación de redes de la trichialina humana con la queratina y entre ella misma. En rojo se representan las redes de la trichialina y en azul la queratina. En amarillo se representa la enzima arginina peptidil deaminasa (PAD) e inicia en la THH dispersando la forma de citrulina más soluble. En verde se pueden observar los residuos de citrulina formando entrecruzamiento con la queratina. Modificado de Steinert et al., 2003.

En la figura 6, se muestran las proteínas reportadas por el servidor Sting (2018) con las cuales la THH interacciona. Algunas de ellas están relacionadas a filamentos intermedios y otras con la envoltura celular. Estas proteínas ofrecen estabilidad mecánica sobre los efectos tensoriales que sufre la célula (Manabe & O'Guin, 1992; O'Guin, Sun & Manabe et al., 1992; Nishizawa et al., 2005).



Nodos		
Los nodos de red representan proteínas	Color de nodo	Contenido de nodo
Las isoformas de empalme o las modificaciones postraduccionales se colapsan, es decir, cada nodo representa todas las proteínas producidas por un solo locus genético codificador de proteínas.	nodos de colores: consulta proteínas y primer ronda de interactores 	nodos vacíos: proteínas de estructura 3D desconocida
	nodos blancos: segundo ronda de interactores 	nodos rellenos: se conoce o predice alguna estructura 3D

	Vecinos	Fusión de genes	Co-ocurrencia	Coexpresión Experimental	Base de datos	Extracción de datos	Homología
IVL							
LOR							
SPRR1A							
SPRR1B							
SPRR3							
DSG4							
FLG							
LCE3B							
RPTN							
LCE3E							

Bordes			
Los bordes representan asociaciones proteína-proteína	Interacciones conocidas	Interacciones predichas	Otros
Las asociaciones deben ser específicas y significativas, es decir, las proteínas contribuyen conjuntamente a una función compartida. Esto no significa necesariamente que se unan físicamente entre sí.	Provenientes de bases de datos curadas 	Genes vecinos 	Extracción de textos
	Determinado experimentalmente 	Fusiones de genes 	Coexpresión
		Co-ocurrencia de genes 	Homología de proteínas

Clave	Socios funcionales pronosticados-descripción	Puntuación
IVL	Involucrina; Parte de la envoltura celular cornificada insoluble (CE) de epitelios escamosos estratificados; Pertenece a la familia de la involucrina (585 aa)	0.974
LOR	Loricrina; Proteína de la envoltura celular de los queratinocitos principales; Familia precursora de envoltura cornificada (312 aa)	0.974
SPRR1A	Cornifina-A; Proteína de la envoltura reticulada de los queratinocitos. Es una proteína queratinocitaria que aparece por primera vez en el citosol celular, pero finalmente se enlaza a las proteínas de la membrana mediante la transglutaminasa. Todo lo que resulta en la formación de una envoltura insoluble debajo de la membrana plasmática; Pequeñas proteínas ricas en prolina (89 aa)	0.966
SPRR1B	Cornifina-B; Proteína de la envoltura reticulada de los queratinocitos. Es una proteína queratinocitaria que aparece por primera vez en el citosol celular, pero finalmente se enlaza a las proteínas de la membrana mediante la transglutaminasa. Todo lo que resulta en la formación de una envoltura insoluble debajo de la membrana plasmática. Puede funcionar como donante y aceptor de aminas en enlaces cruzados mediados por transglutaminasa; Pertenece a la familia Cornifin (SPRR) (89 aa)	0.958
SPRR3	Proteína Pequeña 3 rica en prolina; Proteína de la envoltura reticulada de los queratinocitos; Pequeñas proteínas ricas en prolina (169 aa)	0.956
DSG4	Desmogleína-4. Componente de las uniones desmosómicas intercelulares. Participa en la interacción de las proteínas de la placa y los filamentos intermedios que median la adhesión célula-célula. Coordina la transición de la proliferación a la diferenciación en los queratinocitos del folículo piloso (por similitud); Cadherinas desmosomales (1059 aa)	0.936
FLG	Filagrina; Agrega los filamentos intermedios de queratina y promueve la formación de enlaces disulfuro entre los filamentos intermedios durante la diferenciación terminal de la epidermis de mamíferos; Dominio de mano EF que contiene (4061 aa)	0.936
LCE3B	Proteína de la envoltura cornificada tardía 3B; Precursores de la envoltura cornificada del estrato córneo; Pertenece a la familia LCE (95 aa)	0.936
RPTN	Repetin; Participa en la formación de la envoltura celular cornificada. Proteína de matriz epidérmica multifuncional. Se une reversiblemente el calcio; Dominio de mano EF que contiene (784 aa)	0.936
LCE3E	Proteína 3E de la envoltura cornificada tardía; Precursores de la envoltura cornificada del estrato córneo (92 aa)	0.936

Figura 6. Interactoma de la tricohialina humana (THH). De acuerdo con el servidor String se reportaron las proteínas con las cuales interacciona la THH. Cada una de ellas claramente están relacionadas a filamentos intermedios o son filamentos intermedios que otorgan estabilidad a la célula. Obtenida con el servidor String en el 2018.

3. Justificación

El citoesqueleto subpeliclar de *T. gondii* no solo otorga la forma polarizada de los diferentes estadios parasitarios, sino que está involucrado en los procesos de invasión, migración, proliferación y egreso del parásito. Durante la extrusión del conoide y la invasión, el parásito se somete bajo elevadas tensiones mecánicas, por lo cual debe existir una molécula que permita soportar dicho estrés mecánico. Hasta el momento no se ha determinado la presencia de filamentos intermedios ni otras moléculas relacionadas a ellos en *T. gondii* ni en otros Apicomplexas. En nuestro grupo de investigación se evidenció mediante análisis proteómico del citoesqueleto subpeliclar de taquizoítos de *T. gondii*, una proteína relacionada con filamentos intermedios que hemos denominado trichialina like. El estudio de la trichialina like de *Toxoplasma* nos permitirá conocer su distribución en el citoesqueleto subpeliclar y su posible contribución en las propiedades elásticas del parásito y de resistencia a las fuerzas tensoriales a las que se encuentra sujeto durante la extrusión del conoide, la motilidad por gliding sobre la membrana de la célula blanco, en la internalización y externalización del parásito de la célula invadida.

4. Hipótesis

La trichialina like es un componente que forma parte del citoesqueleto subpeliclar de *T. gondii* que contribuye a la estabilidad de la red subpeliclar del citoesqueleto y a la resistencia al parásito contra efectos tensoriales que se generan durante la extrusión del conoide y la invasión celular.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar a la tricohialina like de *T. gondii*, así como conocer su papel en la organización del citoesqueleto subpeliclar.

5.2. Objetivos específicos

1. Estudiar por bioinformática las propiedades estructurales de la tricohialina de *T. gondii*.
2. Evaluar la presencia de tricohialina en extractos totales de taquizoítos y extractos de citoesqueletos.
3. Determinar la localización topográfica de la tricohialina en taquizoítos extracelulares en reposo, en la extrusión del conoide y en invasión.
4. Determinar a nivel ultraestructural la localización de la tricohialina en aislados de citoesqueletos subpeliculares.
5. Identificar complejos moleculares asociados a tricohialina.
6. Evaluar la capacidad de la tricohialina para autopolimerización *in vitro*.
7. Evaluar el efecto de inhibidores de citoesqueleto en la organización del citoesqueleto subpeliclar de taquizoítos y sobre la distribución de la tricohialina.

6. Estrategia Experimental

Se siguió la siguiente estrategia experimental que se muestra en la Figura 7.

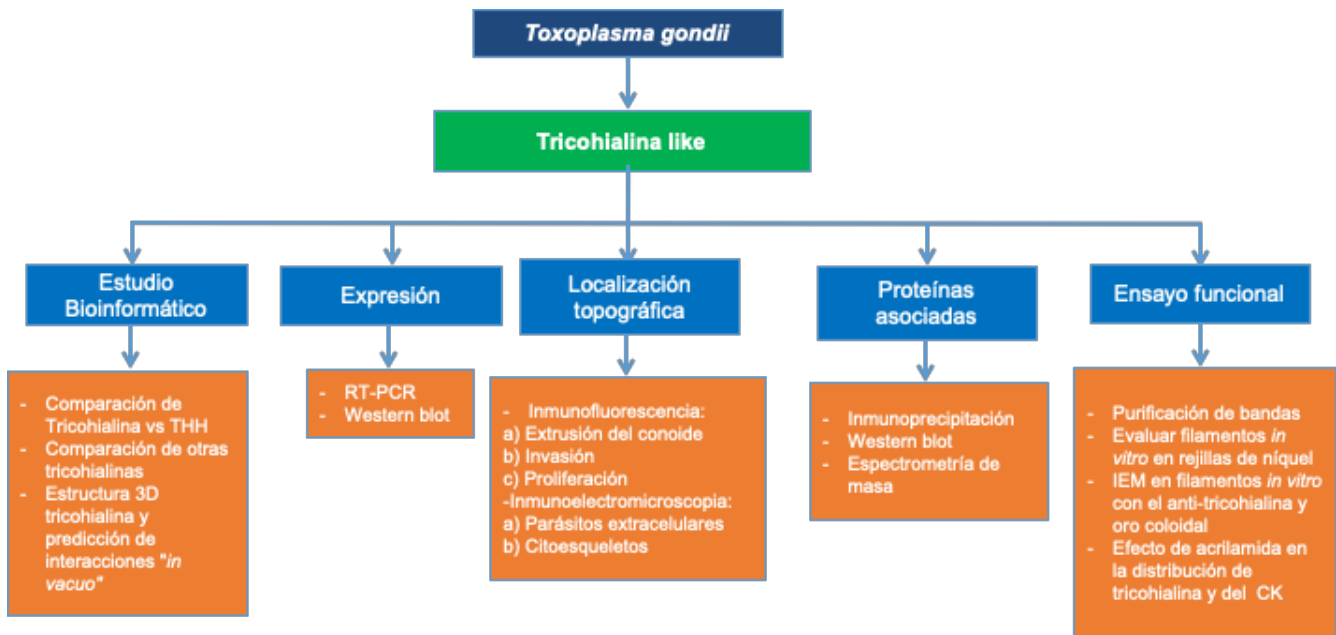


Figura 7. Estrategia experimental para la caracterización de la tricohialina like.

7. Materiales y Métodos

7.1. Análisis bioinformático de la tricohialina like

7.1.1. Determinación de los dominios de la tricohialina

Se descargaron de la base de datos ToxoDB versión 41 (13 de diciembre de 2018) las secuencias de la tricohialina putativa A y tricohialina putativa B, con clave de acceso: TGGT1_242790A y TGGT1_242790B, respectivamente provenientes de *T. gondii* cepa GT1, así como de la THH de la base de datos de UniProtKB clave de acceso Q07283. Se realizó una predicción en las proteínas de dominios con el programa NCBI Conserved Domain Search-NCBI. Previamente se sometieron a un alineamiento local entre cada una de ellas con el programa BLAST del NCBI, es decir la tricohialina putativa A contra la tricohialina B putativa, la tricohialina putativa A contra la THH y la tricohialina putativa B contra la THH.

7.1.2. Determinación de péptidos repetidos

Con el fin de determinar en las tricohialinas putativas de *Toxoplasma* la presencia de repetidos en heptada que se han descrito en filamentos intermedios de mamíferos y en los cuales se le

ha atribuido la función para autopolimerizarse y formar filamentos. Se sometieron al análisis con el programa RADAR (Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats) del EMLB-EBI (European Molecular Laboratory-European Bioinformatics Institute).

7.1.3. Predicción de las interacciones de la tricohialina like

Se obtuvo primero la estructura tridimensional teórica de la tricohialina putativa B o tricohialina like por medio del servidor de I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Después esta estructura se evaluó con el programa RAMPAGE-Ramachandran Plot Analysis (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). Con la estructura de la tricohialina like se realizó las interacciones "in vacuo" con el servidor ClusPro protein-protein docking. El modelo de monómero fue sometido a una primera ronda de docking entre ella misma usando el servidor ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/login.php>). Esta plataforma ofrece cuatro conjuntos de complejos diméricos: equilibrado (la suma de energías atractivas y repulsivas), favorecimiento electrostático, favorecimiento hidrofóbico y fuerzas de Van der Waals. De estos, el complejo equilibrado correspondiente a la predicción superior se mantuvo en formato PDB y se incluyó como plantilla para una segunda ronda de acoplamiento utilizando la misma plataforma para generar el tetrámero correspondiente. El modelo equilibrado predicho superior obtenido se visualizó y editó utilizando el software UCSF Chimera v 10.0.1 de la University de California en San Francisco.

7.1.4. Análisis del dominio PTZ00121

Las secuencias de las tricohialinas de diferentes organismos obtenidas del GenBank se compararon por medio de un alineamiento múltiple de secuencias con el programa MUSCLE, pero sólo con la sección del dominio PTZ00121 previamente obtenida con el programa NCBI Conserved Domain Search-NIH. Las cuales fueron editadas y se alinearon sólo los dominios PTZ00121 de la tricohialina putativa A , tricohialina like de *T. gondii*, tricohialina putativa de *Entamoeba histolytica* (clave de acceso XP_001913756.1), tricohialina de *Trypanosoma cruzi* (clave de acceso RNF24227.1), THH (clave de acceso NP_009044.2), tricohialina putativa de *Neospora caninum* (clave de acceso XP_003882019.1) y los dos dominios PTZ00121 de la tricohialina putativa de *Hammondia hammondi* clave de acceso XP_008884399.1. Con las se-

cuencias del dominio PTZ00121 de los organismos antes mencionados se realizó un alineamiento con el programa T-coffee y después editadas eliminando los huecos. Los árboles filogenéticos se obtuvieron con el programa T-coffee con el método de Neighbor Joining y con el algoritmo UPGMA: Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Mean. Los árboles obtenidos fueron visualizados con el programa Phylogenetic tree (Newick) viewer de ETE Toolkit.

7.2. Material biológico

7.2.1. Cultivo celular

Se empleó la línea celular HEp-2 (células epiteliales humanas de carcinoma de laringe) (HEp-2, ATCC-CCL 23), las cuales fueron mantenidas en medio mínimo esencial (MEM, GIBCO, Carlsbad, CA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 8% e incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

7.2.2. Taquizoítos de *T. gondii* cepa RH

Los taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH corresponde a la población clonotípica I considerada como una de las cepas de mayor virulencia, con una letalidad del 100% (LD100) al infectar ratones con un solo parásito. Además, presenta una elevada motilidad *in vitro* y una rápida diseminación *in vivo*, por ello no forma quiste en ratones infectados. Esta cepa es de fácil mantenimiento en roedores, ya que después de 3 a 4 días posinfección se obtienen una gran cantidad de parásitos para realizar diversos ensayos (Sabin, 1941).

7.3. Obtención y mantenimiento de *T. gondii* cepa RH

El mantenimiento de los taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* consistió en inocular vía intraperitoneal a ratones hembra cepa Balb/c con $1-5 \times 10^6$ taquizoítos en 100 µL de PBS estéril. A los 3 o 4 días se sacrificó el ratón por dislocación cervical, se inocularon 5 mL de PBS pH 7.2 estéril en la cavidad peritoneal y se cosechó la suspensión peritoneal, rica en taquizoítos. Ésta se centrifugó a 700 x g y a temperatura ambiente (TA) durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 3 mL de PBS. Los taquizoítos fueron purificados a través de filtros de 5 µm para eliminar los macrófagos presentes en el líquido peritoneal. Se ajustó el número de taquizoítos con PBS y se inoculó la cantidad indicada con anterioridad a ratones sanos para continuar con el mantenimiento de la cepa. Durante la manipulación de

taquizoítos se siguieron las medidas de bioseguridad para el manejo de patógenos con nivel tipo II, es decir, el uso de bata, guantes, cubre bocas y bajo condiciones asépticas y uso de campana de bioseguridad tipo II. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Los ratones infectados fueron resguardados en el Biotorio del UPEAL Cinvestav-IPN.

7.4. Infección de células con taquizoítos de *T. gondii*

Se cultivaron células HEp-2 con un inóculo de 1.6×10^6 células en medio de cultivo MEM al 8% SFB (Bioproducts, Jalisco, México), cuando se alcanza un 70% de confluencia se infectan con taquizoítos en una relación 1:30 (célula-parásitos) por 2 h. Posteriormente se lavan las células con medio MEM, para eliminar los parásitos extracelulares y se dejan crecer en medio de cultivo MEM al 8% SFB y se incuban en CO₂ al 5%, 37 °C y a los tiempos deseados para cada experimento.

7.5. Anticuerpo anti-tricohialina like de *T. gondi*

En la presente tesis se utilizó un anticuerpo generado en el laboratorio previamente contra tricohialina like de *Toxoplasma* con la ayuda técnica de la QFB. Mónica Mondragón y la M. en C. Rosalba Cruz. A manera de una breve reseña se describe como se generó este anticuerpo. Primero se diseñaron dos péptidos inmunogénicos y accesibles a partir de la secuencia de la tricohialina like con clave de acceso TGGT1_242790B de la base de datos de ToxoDB de *T. gondii* cepa ME49 y utilizando los programas *Kolaskar and Tongaonkar* y *Emini surface*, ambos obtenidos de la plataforma Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB). Los dos péptidos, FDVLKEKQKEKPKG V y DISALEEAWLLHRLRRKPKEA, fueron sintetizados por la compañía GeneScript®. Se inmunizaron cuatro ratones hembra cepa Balb/c con 50 µg de cada péptido y en presencia del adyuvante TiterMax Gold® (Sigma-Aldrich, MO), vía intraperitoneal. Obteniéndose previamente los sueros preinmunes. Después de tres refuerzos con 50 µg del péptido disuelto en PBS, se sangraron los ratones al día 28 y se obtuvo el suero. Se tituló por ELISA usando el péptido como antígeno (Figura 8).

se muestra la estructura tridimensional de la tricohialina like, marcando en azul y rojo los péptidos seleccionados. Los insertos B y C corresponden a acercamientos de los péptidos FDVL-KEKQKEKPKG (marcado en rojo) y DISALEEAWLLHRLRRKPKEA (marcado en azul) respectivamente.

7.6. Extracción de RNA total

A partir de 10^8 parásitos se obtuvo el RNA total utilizando el kit de Trizol® Invitrogen (Carlsbad, California). Se siguieron los pasos indicados por el proveedor para el aislamiento total de RNA. Éste se almacenó a -70 °C hasta su uso.

7.7. Obtención de cDNA total

A partir de 1.5 µg de RNA total se mezclaron con 1 µL OligoT® Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), se incubó a 70 °C durante 4 min; esta mezcla se mantuvo en hielo. Posteriormente se añadió una mezcla disuelta en el buffer de primera cadena: 2 µL de DTT, 2 µL dNTPs (0.2 mM de cada uno) y 1 µL (200 U/µL) de la retrotranscriptasa de virus de la leucemia murina-MLV Invitrogen™ en un volumen final de 8 µL. Se incubó a 37 °C durante 1.2 h. Se mantuvo a 94 °C durante 6 min. Por último, la mezcla se dejó a 4 °C. El cDNA se almacenó a -70 °C hasta su uso.

7.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de 1.5 µg de cDNA se llevó a un volumen final de 25 µL con una mezcla que contiene: $MgCl_2$ 1.5 mM, Taq DNA polimerasa Invitrogen™ 5 U, de cada dNTP 0.2 mM, y 20 pmol de cada uno de los oligos específicos para amplificar cada tricohialina y para actina que se usó como control positivo, y que fueron diseñados con el programa Primer-Blast NCBI. Cada secuencia de oligos, condiciones de reacción y tamaño del producto teórico esperado, se muestran en la Tabla 1. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2400® Applied Biosystems (California, USA).

Tabla 1. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar las tricohialinas de *T. gondii*.

mRNA	Oligos	Secuencia	Condiciones de reacción	Talla del producto
Actina	Act-for	5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATG-3'	94 °C, 3.21 min; 94 °C 30 seg; 55 °C, 30 seg y 72 °C, 30 seg, 30 ciclos; 72 °C, 7 min y 4 °C.	766 pb
	Act-rev	5'-GATCTTGATCTCATGGTGCTAGG-3'		
Tricohialina putativa A	THHA-5	5'-CCAACTCTGCGTCGATCTGT-3'	94 °C, 3.21 min; 94 °C, 30 seg; 59 °C, 30 seg y 72 °C, 30 seg, 35 ciclos; 72 °C, 7 min; 4 °C.	697 pb
	THHA-3	5'-CCGCTTTGAGTCCCTCT-3'		
Tricohialina like	THHB-5	5'-GACTCTGAGAGGGACCGAGT-3'	94 °C, 3.21 min; 94 °C, 30 seg, 55 °C, 30 seg y 72 °C 30 seg, 30 ciclos; 72 °C, 7 min; 4 °C.	314 pb
	THHB-3	5'-TCTCCTCCGAAGAACGGGAT-3'		

7.9. Electroforesis de productos de PCR en geles de agarosa

Los productos de PCR y el marcador de peso molecular (Plus DNA ladder™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) se mezclaron con azul de bromofenol 2X, se cargaron en pozos de un gel de agarosa al 1% en TBE (Tris boratos-EDTA) con bromuro de etidio y se sometió a electroforesis a 80 voltios, y se registró en un fotodocumentador EZ Imager Bio-Rad Hercules, CA.

7.10. Purificación de amplicones para su secuenciación

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE. Las bandas se cortaron y se purificaron con el kit PureLink™ Quick Gel Extraction de Thermo Fisher Scientific siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante, y se llevaron a secuenciar en la Unidad de Proteómica y Metabolómica del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) del Cinvestav-IPN. Los datos obtenidos fueron analizados para alineamiento local de secuencias con el programa BLAST (Pattern Hit Initiated-Basic Local Alignment Search Tool), de la plataforma NCBI. De esta forma corroborar que las secuencias corresponden a cada secuencia blanco.

7.11. Aislamiento del citoesqueleto subpelicular de *T. gondii*

Para aislar el citoesqueleto subpelicular de taquizoítos se usó la metodología reportada por Patrón y colaboradores (2005). Una vez purificados los taquizoítos, se resuspendieron en la solución PHEM-Tritón X-100 (Hepes 100 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Tritón X-100 0.05%, a pH 6.9, con inhibidores de proteasas: TPCK: N-tosil-L-fenilalanina clorometilcetona 100 mM,

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM y TLCK: N- α -tosil-L-lisina clorometilcetona 100 mM) y se incubaron por 1 min a TA. Después se centrifugó a 140,000 x g, 4 °C durante 15 min. El botón (componentes del citoesqueleto) se resuspendió en 1 mL de PHEM sin tritón y se centrifugó a 13,000 x g por 10 min, 4 °C. En tanto el sobrenadante se precipitó con isopropanol y se almacenó a -20 °C. El exceso de PHEM se retiró y el botón se resuspendió en regulador de lisis más los inhibidores de proteasas (TPCK, PMDF y TLCK). El sobrenadante después de precipitar con acetona se colocó en el buffer de lisis como el extracto de citoesqueletos.

7.12. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se preparó una curva patrón con concentraciones de albumina sérica bovina (BSA) desde 0.05 hasta 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBS a partir de una solución patrón de albumina de 1 mg/mL en PBS. De cada una de las concentraciones preparadas se colocaron 10 μl en cada pozo y por triplicado, y las muestras problema fueron diluidas por duplicado utilizando una placa de ELISA de 96 pozos transparentes. Más adelante se añadieron 200 μL de solución de Bradford (1:5) y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector marca Bio-Rad modelo 680 XR, CA (Bradford, 1976).

7.13. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Alícuotas equivalentes a 20 μg de extracto proteico disueltos en buffer de Laemmli fueron cargados y separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% a 100V. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie o con nitrato de plata. Para geles con 10 pozos se colocaron 20 μg de muestra por cada uno y para geles preparativos 250 μg . Todos se digitalizaron en un fotodocumentador EZ Imager, Bio-Rad Hercules.

7.14. Ensayo de Western blot (Wb)

Las muestras de citoesqueleto subpeliculares y extractos totales (preparados como Gómez de León et al., 2014) se separaron mediante SDS-PAGE al 7.5%. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa previamente activada en regulador de transferencia bajo las condiciones siguientes: a 200 mA durante 1 h. La membrana después se bloqueó con leche al 5% en TBS-T (Buffer Tris salino con Tween20[®] al 0.1%) durante 2 h y se incubó por toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario disuelto en TBS-T con agitación. Se retiró el anticuerpo primario y

se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con TBS-T. Se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario acoplados a peroxidasa de rábano (α -ratón, α -conejo o α -chivo, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA, dilución 1:7000 en TBS-T) por 1 h. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con TBS-T y la reacción se reveló de acuerdo con la metodología del kit ECL Western blotting analysis system kit (GE, Buckinghamshire, UK), y se usaron placas radiográficas marca Kodak®. Se empleó como anticuerpo primario producido en chivo anti-tricohialina THH policlonal (1:3000) Santa Cruz Biotechnology (reconoce la región amino terminal de la THH) y anticuerpos anti-tricohialina like (1:3000) producidos en nuestro laboratorio. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-GAP45 (1:10000) y anti-IMC1 (1:5000) fueron donados por la Dra. Dominique Soldati (Department MIMOL, UNIGE, CH). El anticuerpo monoclonal de conejo SAG1 (1:1000) fue donado por la Dra. Corinne Mercier (Université Joseph Fourier Grenoble, France).

7.15. Geles bidimensionales

Extractos de citoesqueleto de taquizoítos se separaron en geles en dos dimensiones en un equipo Mini Protean System (Bio-Rad, CA). Para el isoelectroenfoco se colocaron 200 μ g de una fracción enriquecida de citoesqueleto de *T. gondii* disuelto en 100 μ L de buffer de muestra (urea 7 M, tiourea 2 M, Chaps 4%, DTT 60 mM, buffer de anfolinas 2%, TPCK 10 μ M, TLCK 10 μ M, TPCK 100 μ M) y se llevó a un volumen final de 125 μ L con solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, Chaps 4%, azul de bromofenol stock 0.1%). Se añadieron 10 μ L de Nanopure Water (Bio-Rad) a 2 cuadritos de papel filtro y se colocaron en cada uno de los electrodos de la placa para isoelectroenfoco (Bio-Rad). Se distribuye la muestra en la placa de equilibrio/rehidratación (Bio-Rad) cubriendo tiras de anfolinas en el intervalo de pH 3-10 y de 7cm. A esta se añadió 1 mL de aceite mineral y se dejó rehidratar la tira a TA, por 14 h y se sometió a isoelectroenfoco bajo las siguientes condiciones: Step 01, 250 V, Ramp: L, Time: 00:20; Step 02, 4000 V, Ramp: L, Time: 02:00 y Step 03, 4000 V, Ramp: R, Vhour: 10000. Una vez finalizada la primera dimensión se coloca la tira en 5 mL de buffer de equilibrio (urea 6 M, Tris 50 mM pH 8.8, glicerol 30 %, SDS 2%, azul de bromofenol) y DTT 1% y se agita por 15 min. Después se incubó la tira en 5 mL de buffer de equilibrio y yodoacetamida 2.5 % y se agitó durante 15 min, se lavó con 1 mL de agua MQ. Se realizó la segunda dimensión, en donde se colocó la tira y el marcador de peso molecular en un gel de poliacrilamida al 7.5%,

se cubrió con agarosa y se corrió la electroforesis en una dimensión a 125 V a 4 °C. Después, el gel se tiñó con azul de Coomassie o se transfirió a papel de nitrocelulosa para Western blot.

7.16. Ensayo de inmunoprecipitación

Para determinar las proteínas que interactúan con tricohialina de *Toxoplasma*, se empleó la técnica de inmunoprecipitación. Para este propósito se disolvió un extracto de citoesqueleto de taquizoítos (4×10^8 parásitos) en 500 μ L de solución RIPA I (Tris-OH 50 mM pH 8.0, NP40 1%, Tritón 1%, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 1%, SDS 0.1%, EDTA 2.5 mM, PMSF 0.1 mM, TLCK 0.1 μ M, TPCK 0.1 mM). Se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Se incubó lo equivalente a 1 mg de proteína con el anticuerpo anti-tricohialina (10 μ L), en agitación suave toda la noche a 4 °C. Se adicionó proteína G-agarosa (40 μ L/mg de proteína) a la mezcla proteína-anticuerpo en agitación suave toda la noche a 4 °C. Se centrifugó el complejo proteína-anticuerpo-proteína G a 11,000 x g, a 4 °C, por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se guardó hasta su uso. El botón se lavó 2 veces con 200 μ L de RIPA II (Tris-OH 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Tritón 0.2%, desoxicolato de sodio 0.2%, SDS 0.02%, PMSF 0.1 mM, TLCK 0.1 mM, TPCK 0.1 mM). Entre cada lavado se centrifugó a 11,000 x g, a 4 °C, por 10 min. El botón se resuspendió en buffer de muestra 2X y se hirvió durante 5 min. El inmunoprecipitado se colocó en buffer de muestra 4X complementado con 2.5 μ L de β -mercaptoetanol por cada 100 μ L de buffer de muestra. Ésta se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5% a 80V y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para su procesamiento y análisis por espectrometría de masas (MS).

7.17. Espectrometría de masas (MS)

Se cargaron 30 μ g de extracto de citoesqueletos o inmunoprecipitado con buffer de muestra 2x en un gel de poliacrilamida al 10% y se realizó la electroforesis hasta que el colorante hubiese migrado aproximadamente 1 cm dentro del gel a partir del separador. Se tiñó con azul de Coomassie. Se cortó el gel o el spot (gel 2D) tomando la banda que contiene todas las proteínas y se digirió enzimáticamente con tripsina grado MS (modificado de Shevchenko et al. 2006). Los péptidos concentrados se cargaron en una precolumna V/M con una trampa C18 de simetría (Waters, Milford, MA): 180 μ m x 20 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula de 5 μ m desalinizados utilizando como fase móvil A: 0,1% de ácido fórmico (FA) y de

fase móvil B: 0.1% de FA en acetonitrilo (ACN), bajo los gradientes isocráticos 99.9% de fase móvil A y 0.1% de la fase móvil B, a un flujo de 5 μ L/min durante 3 min. Los péptidos fueron cargados y separados en una columna HSS T3 C18 (Waters): 75 μ m \times 150 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula 1.8 μ m, empleando un UPLC ACQUITY M-Class (Waters) con las mismas fases móviles siguiendo el siguiente gradiente: 0 min, fase B 7%; 121.49 min, fase B 40%; de 123.15 a 126.46 min, fase B 85%; y 129 a 130 min, fase B 7%. Todo a un flujo de 400 nL/min, 45 °C. Los datos espectrales se adquirieron por medio de un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters) con ionización por electrospray (ESI) y por separación de movilidad iónica (IMS), utilizando el enfoque de adquisición independiente de datos (DIA) por modo HDMS^E (Waters). La placa de sintonización para la fuente de ionización se configuró con los siguientes parámetros: 2.60 kV en el capilar de muestreo, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en el desplazamiento de la fuente, 70 °C para la temperatura de la fuente, 0.6 bar para el gas de nanoflujo, y 120 L/h para el flujo de gas de purga. Se adquirieron dos cromatogramas, de baja y de alta energía, en modo positivo, en un intervalo de 50-2000 m/z con una velocidad de 0.5 escaneos/s. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, mientras que para el de alta energía los iones precursores se fragmentaron usando una rampa de energía de colisión de 19–55 V. Los archivos crudos sin procesar, que contienen espectros MS y MS/MS, se desconvolucionaron y se compararon usando el software ProteinLynx Global Server (PLGS) v3.0.3 (Li et al., 2009) (Waters) contra una base de datos inversa *T. gondii* GT1 (descargada de ToxoDB versión 41 (13 de diciembre de 2018)). Los parámetros del flujo de trabajo incluyeron la tripsina como enzima de corte y la predicción de un sitio de escisión perdido en péptidos trípticos; carbamidometilo (C), como una modificación fija; y amidación (N terminal) y desamidación (N, Q), oxidación de metionina (M) y fosforilación (S, T, Y) como modificadores variables: tolerancia automática de péptidos y fragmentos, y coincidencias mínimas de iones de fragmentos por péptido, 2; coincidencias mínimas de iones de fragmentos por proteína, 5; coincidencias mínimas de péptidos por proteína, 1; y una tasa de falso de cobertura (FDR) \leq 4%. Todas las identificaciones tuvieron un porcentaje de confiabilidad \geq 95% (Protein AutoCurate green). Synapt G2-Si se calibró con [Glu¹]-Fibrinopéptido, [M + 2H]²⁺=785.84261 a \leq 1.5 ppm. Para el caso de la MS cuantitativa se colocó como control po-

sitivo una cantidad conocida de la enzima alcohol deshidrogenasa 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa ATCC 204508), Uniprot ID= P00330 marca Waters Corporation (NYSE: WAT), Cat. 186002328.

7.18. Ensayo de inmunofluorescencia

Para los parásitos extracelulares, en proceso de invasión y proliferación en células Hep-2, se realizaron los pasos siguientes para su procesamiento de inmunofluorescencia. La muestra se fijó con paraformaldehído (PAF) al 4% (Electron Microscopy Science, Washington, PA) en PBS, se incubó a TA durante 30 min y se lavó con PBS. La muestra se permeabilizó con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, MO) 0.2% en PBS durante 7 min. A continuación, la muestra se bloqueó con Suero Fetal Bovino 1% en PBS y se incubó en agitación a TA durante 30 min. Se añadió el anticuerpo anti-tricohialina de chivo comercial en una dilución 1:3000 o el de ratón producido en el laboratorio (1:3000), o un anticuerpo anti-GAP45 (1:5000) y se dejó incubando en agitación a TA durante 1 h y luego a 4° C toda la noche. Posteriormente se lavó con PBS y se añadió el anticuerpo secundario anti IgG chivo o anti IgG de ratón según el anticuerpo primario (dilución 1:7000), usado ya sea acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) o a rodamina, se incubó con durante 1 h a TA y se lavó con PBS. Para teñir el núcleo se colocó una disolución 1:1000 de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Oregon) en agitación a TA durante 20 min. La muestra se montó con Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) y se tomaron fotografías en un microscopio confocal LSM 700 (Carl Zeiss, Jena, Germany) empleando los laser para detectar cada tipo de compuesto fluorescente: en el canal 1 FITC (Excitación: 495, Emisión: 517), en el canal 2 Rodamina (Excitación: 551, Emisión: 573) y canal 3 DAPI (Excitación: 358, Emisión: 464) y a través del objetivo 63X/NA 1.4 con aceite de inmersión. Para procesar las imágenes se empleo el programa ZEN® 2012.

7.19. Microscopía electrónica de transmisión de citoesqueletos subpeliculares de *T. gondii*

Mil parásitos purificados fueron colocados en rejillas de níquel de 200 cuadrículas previamente recubiertas con formval (Polysciences Inc. Warrington, PA) y sombreadas con carbón. Estos fueron expuestos a solución de PHEM-Tritón X-100 al 0.05% e incubados durante un min y lavados con PHEM. A continuación, la muestra se fijó con glutaraldehído (Electron Microscopy

Sciences) 0.1% durante 5 min. El citoesqueleto se lavó con PBS y después con agua MQ, y por último fue procesada para tinción negativa con acetato de uranilo (Electron Microscopy Sciences) 2%. La muestra fue analizada en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 a 80kV en la Unidad de Microscopía Electrónica del LaNSE del Cinvestav-IPN. Para obtener las imágenes en formato TIF se empleo el software JEM-1400 TEM.

7.20. Procesamiento de parásitos en resina LR-White y obtención de citoesqueletos para Inmuno-electromicroscopía (IEM)

Para determinar la ubicación de la tricohialina like a nivel ultraestructural, se embebieron taquizoítos en resina LR-White. La resina permite conservar los antígenos de la muestra, a la cual se le realizaron cortes para identificar la ubicación de la proteína de interés mediante inmuno-electromicroscopía (IEM). Para ello se fijaron taquizoítos –previamente purificados– con una mezcla de PAF (Electron Microscopy Science “EMS”, Washington, PA) al 4% y glutaraldehído (EMS) al 0.05% en PBS en agitación a TA durante 1 h y se lavaron tres veces por centrifugación. La muestra se postfijó con tetraóxido de osmio (EMS) 1% por 5 min, en hielo. Se enjuagó con PBS frío y se lavó también con agua a TA. Se realizaron deshidrataciones consecutivas con etanol absoluto anhidro a concentraciones de 10, 20, 30 y 50%, durante 10 min cada uno, a 4 °C y en 70 y 95% durante 20 min a -20 °C, y en 100% durante 5 min a -20 °C. La muestra se infiltró en la resina LR-White (Electron Microscopy Science, Washington, PA) 1:1 (1 volumen de resina en un volumen de alcohol absoluto 100%), se incubó durante 1 h a -20 °C. Se cambió la muestra a una solución 3:1 (resina:alcohol) y se incubó por 1 h a -20 °C. Se cambió a resina pura y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Finalmente, se realizaron 2 cambios con resina pura con incubación de cada una durante 1 h a -20 °C. Se colocaron las muestras en cápsulas de gelatina llenas con la resina y se polimerizaron durante 24 h expuesta a luz UV a 4 °C. De los bloques resultantes se obtuvieron cortes finos en un ultramicrotomo (Ultra cut Leica, Austria). Los cortes se montaron en rejillas de Nickel de 200 cuadrículas. Las rejillas se sometieron al protocolo de detección de tricohialina por IEM.

Para ensayos de IEM en citoesqueletos, se depositaron 10^3 parásitos vivos en rejillas de níquel, se deshecho el exceso de líquido y se adicionó PHEM-Tritón (Hepes 100 mM, EGTA 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Tritón X-100 0.05%, a pH 6.9, TPCK 0.1 mM, PMSF 0.1 mM y TLCK 0.1 mM) por un min a TA. Se lavó con PHEM sin Tritón 3 veces, se eliminó el exceso de líquido.

Se fijó con glutaraldehído al 0.01% en PBS durante 10 min a TA y se lavaron 3 veces con PBS. Las rejillas se sometieron al protocolo de detección de tricohialina por IEM.

7.21. Detección de tricohialina por IEM en citoesqueletos subpeliculares y en cortes de muestras embebidas en resina LR-White

Para los ensayos de IEM, los cortes finos de parásitos embebidos en LR-White depositados sobre rejillas de Nickel o citoesqueletos aislados, se bloquearon con BSA al 0.05% en PBS por 5 min, se lavaron tres veces incubando a TA durante 1 min con PBS. Se colocó el anticuerpo anti tricohialina comercial o generado en nuestro laboratorio diluido en PBS-T 0.05% toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se lavaron cinco veces con PBS-T. Se colocó el anticuerpo secundario respectivo, acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm, a una dilución de 1:40 en PBS-T y se incubó a TA en una cámara húmeda durante 2 h. Se lavó 5 veces con PBS-T y 3 veces con PBS. Los citoesqueletos o los cortes en resina LR-White se lavaron con PBS-T y después con agua MQ. Por último, fueron procesados para tinción negativa con acetato de uranilo (Electron Microscopy Sciences) al 2%. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 a 80 kV. Como controles negativos, las muestras fueron incubadas con suero normal o con el suero preinmune de las especies correspondientes.

7.22. Inducción de filamentos *in vitro*

Las bandas detectadas por WB con el anticuerpo anti-tricohialina se parearon con geles de SDS-PAGE de extractos de citoesqueletos en SDS-PAGE y se cortaron de los geles y se maceraron en un buffer con Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 0.3 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0 y después incubaron a 25 °C durante 2 h (Modificado de Inagaki et al., 1988). Los fragmentos de geles se sedimentaron y los sobrenadantes fueron recuperados. Los sobrenadantes fueron depositados en rejillas de níquel para su incubación a diferentes tiempos a 37 °C. Algunas rejillas fueron teñidas por tinción negativa con acetato de uranilo y otras fueron procesadas para IEM. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL 1400 a 80 kV.

7.23. Efecto de fármacos sobre citoesqueleto de *T. gondii*

Cuatro extractos de citoesqueletos subpeliculares de 10^8 parásitos se incubaron con: citocalasina D 5 mM en PHEM, colchicina 10 mM en PHEM, acrilamida 15 mM en PHEM, como control negativo se utilizó DMSO 56 μ M en PHEM, que fue la concentración máxima utilizada en la preparación de la citocalasina D. Cada uno de los extractos fue incubado a 25 °C durante 2 h. Se centrifugó el citoesqueleto y se obtuvieron dos fases: un sobrenadante y un botón. El primero se precipitó con una mezcla de metanol/cloroformo/agua (volúmenes 4:3:3). El botón y el sobrenadante se disolvieron en buffer de lisis, se sometieron a electroforesis en gel de poli-acrilamida al 7.5% y se procesaron para Wb para detectar la tricohialina like.

8. Resultados

8.1. Estudio bioinformático de las tricohialinas de *T. gondii*

En 2014 nuestro laboratorio reportó el proteoma del citoesqueleto subpelicular de taquizoítos de la cepa RH, en el cual se detectaron 95 proteínas (Gómez de León et al., 2014), y dentro de las cuales se encuentra una proteína relacionada a filamentos intermedios denominada tricohialina putativa con clave de acceso del NCBI gi|221503729 *T. gondii* VEG. Se revisó en la plataforma actualizada de ToxoDB versión 41 (13 de diciembre de 2018) en la cual están anotadas dos tricohialinas: tricohialina putativa A y tricohialina putativa B, con claves de acceso TGGT1_242790A y TGGT1_242790B, respectivamente. Como se verá más adelante, en el presente trabajo se detectó por espectrometría de masas en el extracto de citoesqueletos subpeliculares de *T. gondii* a la tricohialina B putativa y se etiquetó como tricohialina like. Mediante análisis bioinformático de las dos tricohialinas de *Toxoplasma* (Figura 9) se determinó la localización de sus genes en el cromosoma VI. La tricohialina A putativa se localiza en TGGT1_chrVI:2,195,987..2,203,778 (cadena +) y la tricohialina like en TGGT1_chrVI:2,203,879..2,217,509 (cadena +). El gen de la tricohialina A se constituye por 10 exones (recuadros azules de la Figura 9A) mientras que el gen de la tricohialina like se compone por 23 exones (recuadros morados de la Figura 9A). De acuerdo con la plataforma de ToxoDB, la tricohialina A codifica a una proteína de 81 kDa y la tricohialina like codifica a una de 137 kDa. Con la finalidad de determinar si existe una relación con algún dominio de la proteína THH de la base de datos de Uniprot clave de acceso Q07283, se realizó una predicción de dominios con el programa NCBI Conserved Domain Search-NIH para las secuencias de la tricohialina putativa A y tricohialina like. En la Figura 9B se muestran los dominios que corresponden a la THH, tricohialina A y tricohialina like de *T. gondii*. La THH reportó dos dominios: el primero es S100, que son sitios de unión a calcio, el cual posee un dominio de manos EF de tipo canónico (desde el residuo 2 al 89 con un E-value de 8.662×10^{-22}) y el dominio de la superfamilia PTZ00121 (del residuo 1359 al 1772 con un E-value de 7.61×10^{-07}) (Figura 9B). La tricohialina A se compone por un dominio de la superfamilia PTZ00121 (Figura 9B).

La tricohialina like se compone por el dominio de la superfamilia PTZ00121 (del residuo 1 al 745 con E-value de 4.30×10^{-21}) y por el dominio PRK10929 o también llamado putative mechanosensitive channel protein-MacS (desde el residuo 672 al 869 con un E-value de 1.27×10^{-3}) (Figura 9B). MacS es un canal pequeño mecanosensible y que forma parte del sistema

de salida de soluto impulsado por turgencia que protege a las bacterias de la lisis en caso de choque osmótico. La proteína MacS sola es suficiente para formar un canal funcional mecano-sensible cerrado directamente por tensión en la bicapa lipídica. Las proteínas MacS se compone por heptámeros de tres subunidades transmembranales con siete dominios M3 convergentes y este dominio forma parte de la membrana interna. Por otro lado, el dominio PTZ00121 se encuentra en una serie de proteínas denominadas Merozoite Adhesive Erythrocytic Binding Protein descritas en varias especies de *Plasmodium* y que están involucradas en la invasión y con una localización apical (Kappe et al., 1998; Singh et al., 2004).

Se obtuvieron los residuos repetidos de la tricohialina A y tricohialina like con el programa RADAR (Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats) del EMLB-EBI (The European Bioinformatics Institute). La Tricohialina A se compone por 10 repetidos de la secuencia EQ...EREEWQKH...RAEEERGKQEAIEKAVEEERK en la secuencia de aminoácidos: 332-358, 399-434, 437-467, 470-500, 503-533, 536-566, 569-599, 602-632, 635-665 y 668-603 (Figura 9). La tricohialina like se compone por 5 residuos de la secuencia KKMEQE-REEWQKHRAEVEKGGQQAIEQRAVEEER en la secuencia de aminoácidos: 1-33, 34-66, 67-99, 100-132 y 133-159 (Figura 9).

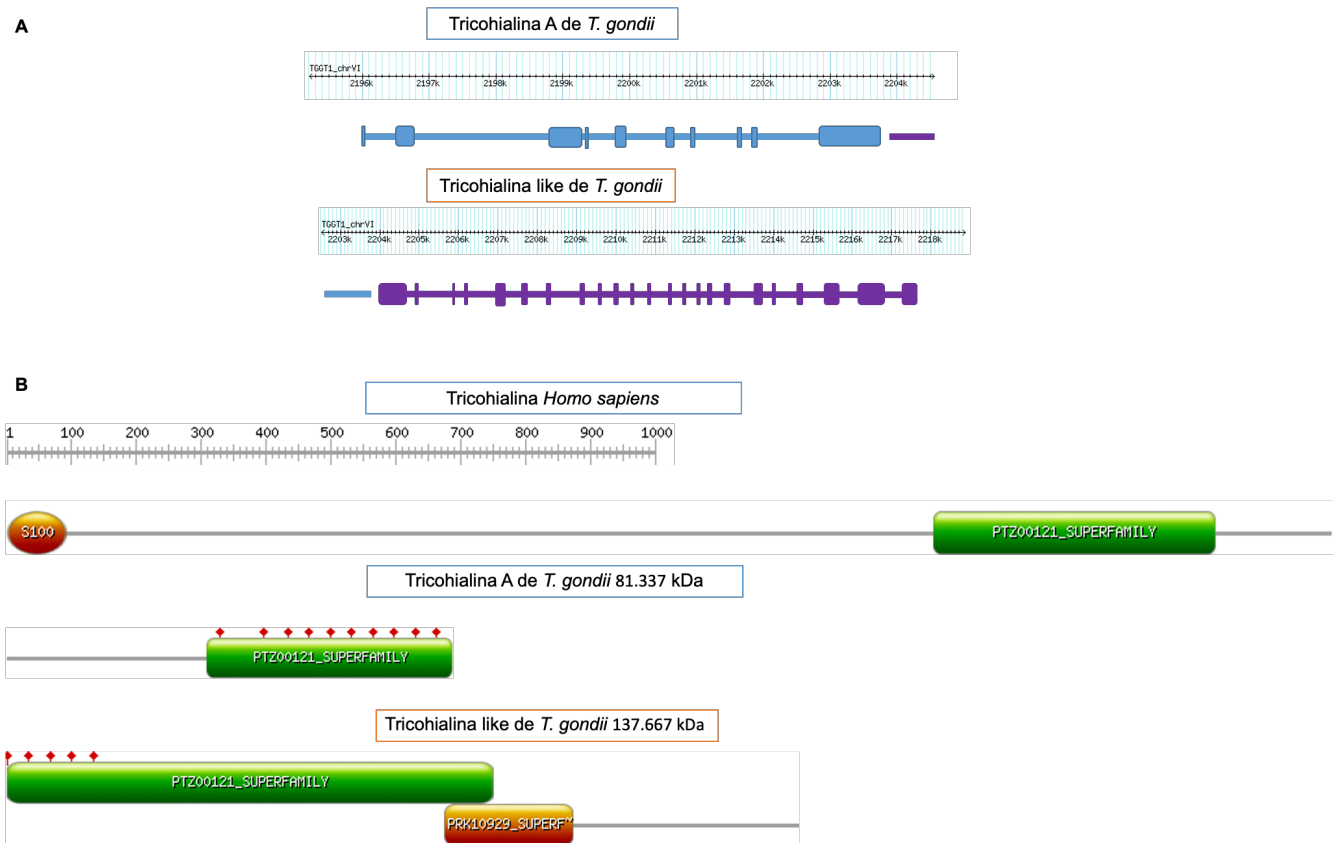


Figura 9. Localización y predicción de dominios de las tricohialinas putativas de *T. gondii*. A. Se muestra la localización de ambos genes en el genoma de *T. gondii*. La tricohialina A putativa se halla en TGGT1_chrVI:2,195,987..2,203,778(+) y la tricohialina like en TGGT1_chrVI: 2,203,879..2,217,509(+). El gen de la tricohialina A se compone por 10 exones (indicados por recuadros azules) mientras que el gen de la tricohialina like posee 23 exones (recuadros morados). B. Los dominios de la tricohialina A, tricohialina like y de la THH se obtuvieron con el programa NCBI Conserved Domain Search-NIH. La tricohialina A codifica a una proteína de 81 kDa y posee un dominio de la superfamilia PTZ00121 entre los residuos 312-963 con un E-value de 7.61×10^{-23} . El gen de la tricohialina like codifica a una proteína de 137 kDa y se constituye por dos dominios: de la superfamilia PTZ00121 (que abarca desde el residuo 1 al 745 con un E-value de 4.30×10^{-21}) y el dominio de la superfamilia PRK10929 o también denominado putative mechanosensitive channel protein se compone desde el residuo 672 al 869 con un E-value de 1.27×10^{-03} . En triángulos de color rojo se marcan los 10 residuos repetidos de la tricohialina A y 5 residuos repetidos de la tricohialina like obtenidos con el programa RADAR (Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats) del EMLB-EBI (The European Bioinformatics Institute). La Tricohialina A se compone por 10 repetidos de la secuencia EQ...EREEWQKH...RAEEERGKQEAIEKAVEEERK en la secuencia de aminoácidos: 332-358, 399-434, 437-467, 470-500, 503-533, 536-566, 569-599, 602-632, 635-665 y

668-603. La tricohialina like se compone por 5 residuos de la secuencia KKMEQEREEWQKH-RAEVEKGGQQEAIQRAVEEER en la secuencia de aminoácidos: 1-33, 34-66, 67-99, 100-132 y 133-159.

El alineamiento local entre las estructuras primarias de proteína de las tricohialinas, es decir, las secuencia entre la tricohialina A con la THH, la tricohialina A con la tricohialina like y la tricohialina like con la THH empleando el programa Clustal Omega del NCBI se muestra en la figura 10. Se usaron las secuencias obtenidas de ToxoDB con clave de acceso TGGT1_242790A y TGGT1_242790B, correspondientes a la tricohialina A y tricohialina B, respectivamente; así como de la THH de la base datos de UniProtKB clave de acceso Q07283. Las secuencias de tricohialina B y tricohialina A presenta bajo grado de similitud con la secuencia de la THH. Entre la tricohialina like y la tricohialina A hay un grado de similitud en la secuencia, la cual coincide en el dominio PTZ00121 y en donde se presentan los residuos repetidos (identidad del 65%).

A unnamed protein product
Sequence ID: Query_137687 Length: 693 Number of Matches: 3

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
19.2 bits(38)	2.1	Compositional matrix adjust.	18/68(26%)	25/68(36%)	17/68(25%)
Query 1875	ERERKLRREIIRQKQEKQRHQVGEIKSQEGKGGHRLLEPCTHQF--ASVPVRS-----	1927			
Sbjct 58	ERERKL R Q E HR I L+P + P+S	108			
Query 1928	-SPLVYI 1934				
Sbjct 109	SP++ + CSFVFPV 116				

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	4.5	Compositional matrix adjust.	21/66(32%)	42/66(63%)	5/66(7%)
Query 282	ERQELRRERQSEEQOQLRREOQLRKKQEERREOQERREOQERREOQERREOQLRR	341			
Sbjct 472	EREWQKRAEEKGGKQ-----EAIEKAVEERKKVQEREWQKRAEEKGGKQEAIEK	526			
Query 342	EQERR 347				
Sbjct 527	EE R AVEEER 532				

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
17.7 bits(34)	6.5	Compositional matrix adjust.	6/21(29%)	9/21(42%)	0/21(0%)
Query 54	VDLILELDDLDGNGRVDNFEP 74				
Sbjct 37	VDVVLRLGGFPPIAVQIQFF 57				

C unnamed protein product
Sequence ID: Query_242629 Length: 1214 Number of Matches: 7

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
243 bits(619)	4e-72	Compositional matrix adjust.	155/239(65%)	180/239(75%)	29/239(12%)
Query 467	KKMQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKVQEREWQKRAEEKGGKQEAIEK	526			
Sbjct 1	KKMQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKVQEREWQKRAEEKGGKQEAIEK	60			
Query 527	AVVEERKMEQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKVQEREWQKRAEEKGGK	586			
Sbjct 61	AVVEERKMEQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKVQEREWQKRAEEKGGK	120			
Query 587	QEATEKAVEERKKMEQEREW-----QKRAEEKGGKQEA--	622			
Sbjct 121	QEAIQRAVEEERNKMEQEREWQKQEREEREKERDGEEMEQLQARADENETARKRVTE	180			
Query 623	IEQAVKEERKKMEQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKVQEREWQKRAEVE	681			
Sbjct 181	LERLVRE-----EQEKNSILETTLEKDEEBALKKEVEERKALVKEVERLTSQAQEV	234			

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
229 bits(585)	1e-67	Compositional matrix adjust.	125/128(98%)	127/128(99%)	0/128(0%)
Query 566	KKTQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKMEQEREWQKRAEEKGGKQEAIEQ	625			
Sbjct 1	KKMQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKMEQEREWQKRAEEKGGKQEAIE+	60			
Query 626	AVVEERKMEQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKMEQEREWQKRAEVEKGG	685			
Sbjct 61	AVVEERKMEQEREWQKRAEEKGGKQEAIEKAVEERKKMEQEREWQKRAEVEKGG	120			
Query 686	QEAIQRAV 693				
Sbjct 121	QEAIQRAV 128				

B unnamed protein product
Sequence ID: Query_213957 Length: 1214 Number of Matches: 2

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.5 bits(36)	6.6	Compositional matrix adjust.	12/27(44%)	16/27(59%)	3/27(11%)
Query 130	EEFPQRRQFRQEQRELAEGERQSE 156				
Sbjct 948	EE P R + E + RE A+GE+ SE EETP---RATEAEBSRETADGEDDSE 971				

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
18.1 bits(35)	7.7	Compositional matrix adjust.	15/40(38%)	19/40(47%)	4/40(10%)
Query 1497	QRDRKFR---EQELRSQEPFRKFLEREEQQLHRQQRK 1532				
Sbjct 970	ERDR R + LR + LEE LIR +R+ K SERDRVRFKREKSLRDAGADISALEEAWLLHRLRKKF 1009				

Figura 10. Alineamiento local entre las tricohialinas de *T. gondii* con la THH. Con el programa Clustal Omega del NCBI se comparan las secuencias de las tricohialinas. Se usaron las secuencias obtenidas de ToxoDB con clave de acceso TGGT1_242790A y TGGT1_242790B, correspondientes a la tricohialina A y tricohialina B, respectivamente; así como de la THH de la base datos de UniProtKB clave de acceso Q07283. A. Se muestra la comparación entre las secuencias de la tricohialina A con la THH. Identidad de 25%. B. Alineamiento entre las secuencias de tricohialina like con la THH. Identidad de 44% pero con muchos huecos. C. Comparación de secuencia entre la tricohialina like con la tricohialina A de *Toxoplasma*. Identidad de 65%.

Con el servidor I-TASSER se obtuvo una predicción de la estructura tridimensional de la tricohialina like de *T. gondii* (Figura 11). La estructura tridimensional de la tricohialina like se compone por dos regiones: la del amino terminal, conformado mayoritariamente por α -hélices,

dos hojas β plegadas y una región que no posee estructura secundaria (intrínsecamente desordenada), y la del carboxilo terminal, compuesta sólo por α -hélices. Los dominios PTZ00121 y PRK10929 se localizan en las estructuras de α -hélices.

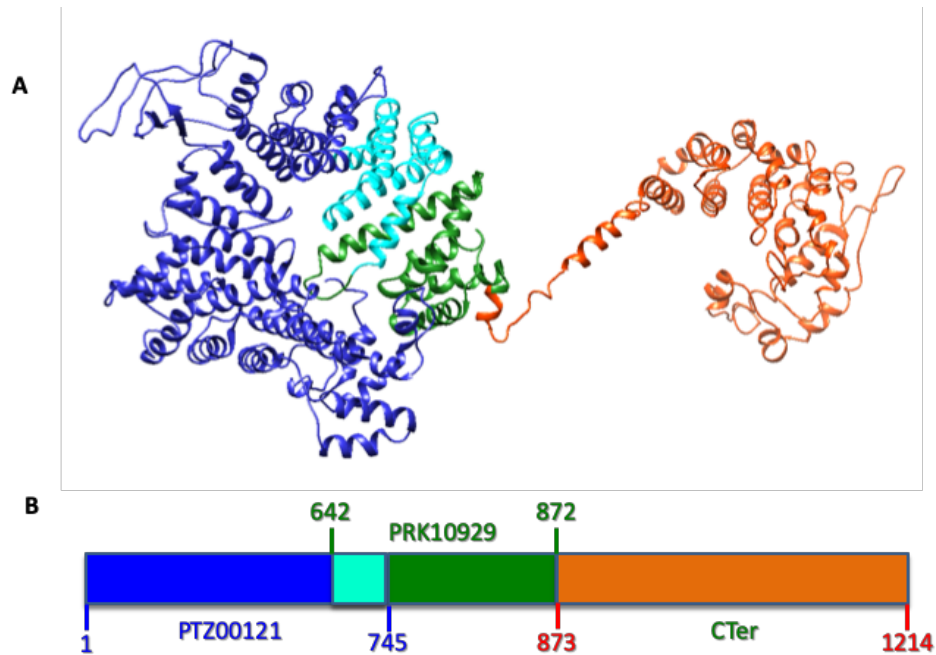


Figura 11. Estructura tridimensional obtenida con I-TASSER de la tricohialina like de *T. gondii*. A. Se muestra la estructura de la tricohialina like que se compone mayoritariamente por α -hélices y dos hojas β y regiones que no poseen estructura secundaria, es decir regiones desorganizadas. Se muestra cada color los dominios que componen esta proteína. En azul el dominio PTZ00121, entre la región entre estos dominios en azul claro, el dominio PRK10929 en verde. En naranja la región carboxilo terminal. B. Dominios de tricohialina like. Se muestra cada uno de los dominios y con el color que representa a la estructura tridimensional.

Una forma de evaluar la estructura tridimensional obtenida con el servidor I-TASSER de la tricohialina like de *T. gondii* es a través del programa RAMPAGE-Ramachandran Plot Analysis. Este software nos permite determinar si cada aminoácido se encuentra en regiones permitidas y prohibidas entre los enlaces N-C (Φ) y C-CO (Ψ) del enlace peptídico de la estructura obtenida con el programa I-TASSER, una aproximación de su estructura secundaria. En la figura 12 se muestra el gráfico de Ramachandran: el 76.7% de los aminoácidos se localizaron en regiones favorecidas, 15.3% en las regiones permitidas y 7.9% en regiones atípicas. En la tabla 7 ubicada en la sección de anexos, se muestran los aminoácidos involucrados en la in-

teracción determinado por el análisis del gráfico de Ramachandran de la estructura tridimensional de la trichialina like. Aunque no corresponde a la mejor estructura tridimensional, si nos da una posible idea de sus interacciones moleculares.

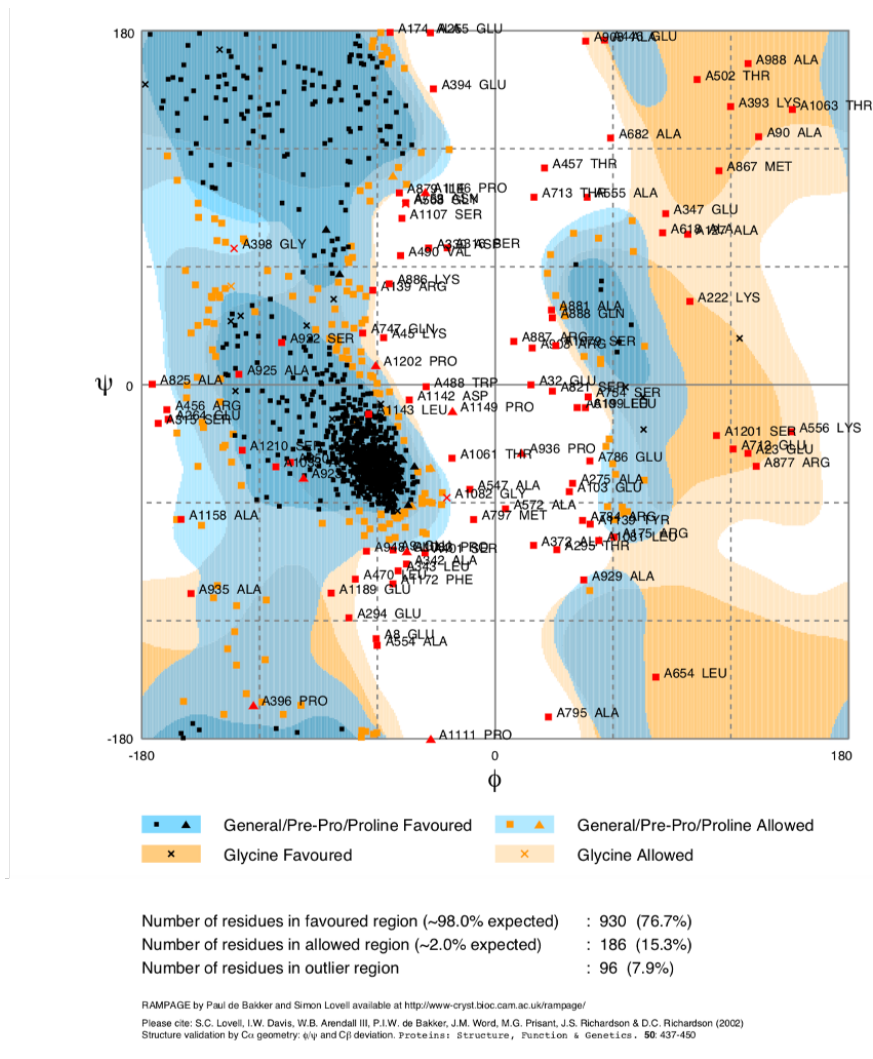


Figura 12. Plot de Ramachandran de la trichialina like de *T. gondii*. Con el programa RAMPAGE se determinó el gráfico de Ramachandran de la trichialina like obtenido con el programa I-TASSER.

Con el propósito de determinar si esta molécula podría tener la posibilidad de autopolimerezarse tal y como ocurre con las moléculas de los filamentos intermedios en mamífero, se determinaron las interacciones "in vacuo" que posee la trichialina like utilizando para ello el servidor ClusPro protein-protein docking. Como se observa en la figura 13A, efectivamente hay una alta probabilidad de que se generen interacciones entre la misma proteína para formar

dímeros, cada monómero está coloreado en naranja o azul. Las interacciones corresponden a enfrentamientos/contactos entre dominios CTer (azul) y PRK10929 (naranja). Los 22 puntos de contacto (pseudouniones) se indican con líneas verdes y los residuos que interactúan se muestran en forma de bola y bastón. La amplificación muestra las zonas de interacción.

Interesantemente, esta molécula también tiene la posibilidad de formar tetrámeros como se muestra en la figura 13B. Cada monómero está coloreado en naranja, azul, magenta o marrón. Las dos interacciones antiparalelas PRK10929-Cter-Cter mantienen a los tetrámeros juntos. Contiene 23 puntos de contacto adicionales (pseudoenlaces) correspondientes a enfrentamientos/contactos entre dominios C-terminales (azul-marrón y magenta-naranja), en comparación con los dímeros (ver figura 11A), se indican mediante líneas verdes y los residuos que interactúan se muestran en conformación de bola y bastón. Cabe destacar que estas estructuras podrían ser esenciales para la formación de autopolímeros y así formar filamentos similares a los filamentos intermedios de mamífero.

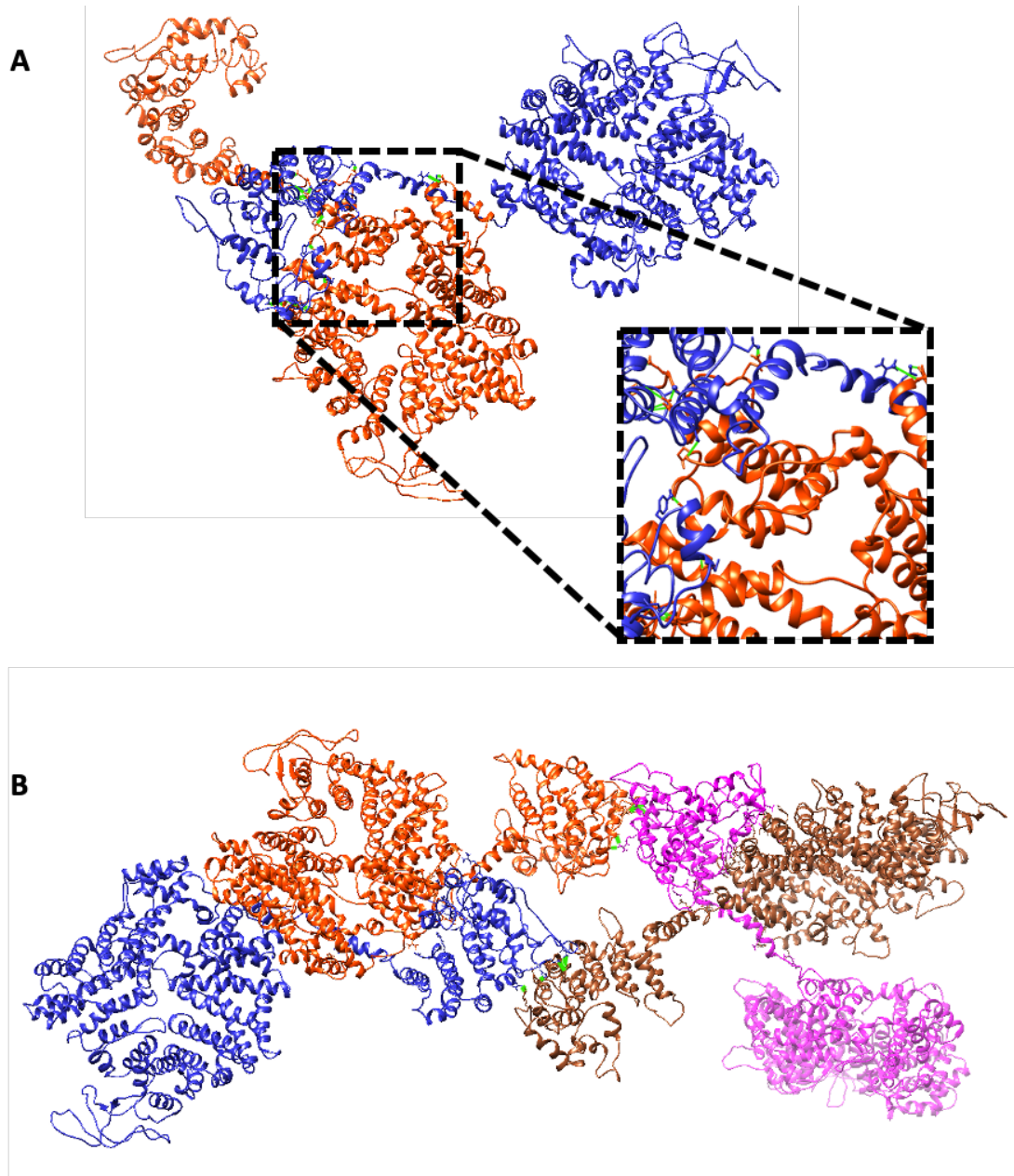


Figura 13. Estructura cuaternaria de la trichialina like de *T. gondii* A. Con el programa servidor ClusPro protein-protein docking se generó las interacciones "in vacuo" de la trichialina like. Se muestra una interacción entre la misma proteína en forma de dímero, cada monómero está coloreado en naranja o azul. Las interacciones corresponden a enfrentamientos/contactos entre dominios CTer (azul) y PRK10929 (naranja). Los 22 puntos de contacto (pseudouniones) se indican con líneas verdes y los residuos que interactúan se muestran en forma de bola y bastón. La ampliación muestra las zonas de interacción. B. La trichialina like formando un tetrámero, cada monómero está coloreado en naranja, azul, magenta o marrón. Las dos interacciones antiparalelas PRK10929-Cter-Cter mantienen a los tetrámeros juntos.

Contiene 23 puntos de contacto adicionales (pseudoenlaces) correspondientes a enfrentamientos/contactos entre dominios C-terminales (azul-marrón y magenta-naranja), se indican mediante líneas verdes y los residuos que interactúan se muestran en conformación de bola y bastón.

8.2. Expresión transcripcional de las tricohialinas de *T. gondii*

Con la finalidad de determinar que las tricohialinas reportadas en el genoma de *T. gondii* efectivamente se expresan a nivel transcripcional, se diseñaron sondas específicas para amplificar las dos tricohialinas y se enviaron a secuenciar para corroborar su identidad. Para ello primero se aisló el RNA total de *T. gondii* por el método de Trizol® (Figura 14A), en el cual se observan las dos unidades 18S y 28S de RNA ribosomal. Después como control se amplificó un fragmento de DNA que codifica a actina (Figura 14B). En la Figura 14C-D se muestra el patrón electroforético en gel de agarosa al 1% de ambos genes, donde se observa una banda con mayor intensidad, correspondiente al gen de la tricohialina like. En el panel del Figura 13C se muestra la amplificación de la tricohialina A putativa, la cual genera un producto de 697 pares de bases. Para la tricohialina like se produce un amplicón de 314 pares de bases (Figura 14B). Los amplicones se purificaron y se secuenciaron para corroborar su identidad. De acuerdo con el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), realizado con la plataforma NCBI, ambas secuencias amplificadas y secuenciadas corresponden al 100% de identidad de las secuencias de mRNA de tricohialina A y tricohialina like (Tabla 2). Cabe destacar una alta similitud con secuencias entre otros Apicomplexas como *Neospora caninum* y *Hammondia hammondi*. Con los resultados de expresión por RT-PCR, se concluye que los genes de la tricohialina son transcripcionalmente activos en taquizoítos de *T. gondii*.

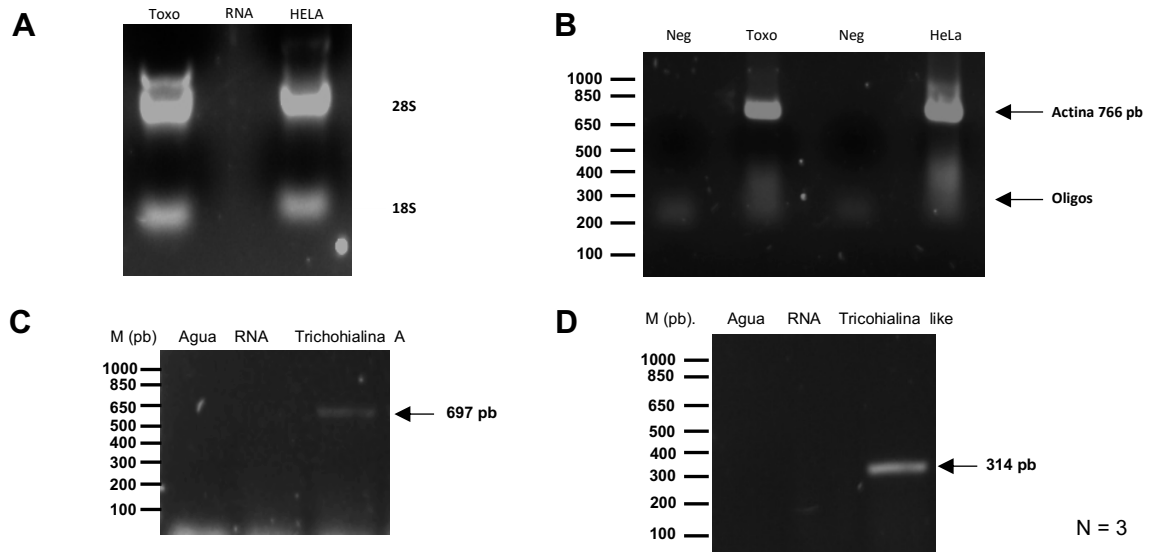


Figura 14. Expresión transcripcional de las trichialinas putativas de *T. gondii*. Electroferogramas en gel de agarosa al 1% en TBE teñidos con bromuro de etidio. A. RNA total de *T. gondii* obtenido con Trizol®. Se muestran las bandas características de las subunidades ribosomales 18S y 28S. B. Como control positivo de RT-PCR, se amplificó el gen de actina, usando cDNA de células HeLa. C. Detección de trichialina putativa A. D. Detección de la trichialina putativa B. M: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases, agua, RNA total de *T. gondii*, como controles del correcto aislamiento de cDNA. HeLa: cDNA de células HeLa.

Tabla 2. Identidad y similitud de trichialina like con secuencias relacionadas a otras especies (BLAST).

Organismo	ID GenBank	Puntuación	% Identidad	% Similitud	Nucleótidos comparados	E-value	% Cobertura
putative trichohyalin [<i>Toxoplasma gondii</i> VEG]	ESS31578.1	2272	100	100	0.97	0	100
TPA: trichohyalin, putative [<i>Toxoplasma gondii</i> VEG]	CEL73095.1	2271	100	98	0.97	0	88
trichohyalin, putative [<i>Toxoplasma gondii</i> ME49]	XP_018637495.1	2264	100	98	0.97	0	77
hypothetical protein TGRUB_242790 [<i>Toxoplasma gondii</i> RUB]	KFG60177.1	2092	98	98	0.99	0	88
hypothetical protein TGVAND_242790B [<i>Toxoplasma gondii</i> VAND]	KFH04897.1	1863	80	98	0.99	0	39
putative trichohyalin [<i>Toxoplasma gondii</i> COUG]	PIM02679.1	1861	879	99	0.99	0	65
hypothetical protein TGARI_242790 [<i>Toxoplasma gondii</i> ARI]	KYF41101.1	1837	80	99	0.98	0	70
trichohyalin, putative [<i>Hammondia hammondi</i>]	XP_008884399.1	1570	96	98	0.75	0	23

hypothetical protein TGPRC2_242790 [<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> TgCatPRC2]	KYK72168.1	1561	67	82	0.97	0	39
hypothetical protein TGFOU_404350 [<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> FOU]	KFG51269.1	1452	60	98	1	0	45
putative trichohyalin [<i>Toxo-</i> <i>plasma gondii</i> TgCATBr9]	PUA87212.1	1395	59	100	0.98	0	58
hypothetical protein TGP89_242790B [<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> p89]	KFG29027.1	1198	50	98	0.98	0	42
hypothetical protein TGMAS_242790 [<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> MAS]	KFH06807.1	1148	48	98	0.98	0	63
hypothetical protein TGP89_242790A [<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> p89]	KFG29025.1	533	23	99	1	1 x 10 ⁻¹⁷⁷	36
putative Trichohyalin [<i>Neos-</i> <i>pora caninum</i> Liverpool]	XP_003882019.1	518	73	100	0.47	3 x 10 ⁻¹⁵⁵	34

La secuencia de *Hammondia hammondi* se compone por 9 repetidos con la secuencia IEKAI.EEERKKME...EEREELKR.....QQDERE.KEKQE en los residuos 257-289, 291-328, 330-361, 363-394, 396-428, 430-461, 463-494, 496-527 y 529-563. Para el caso de la secuencia de *Neospora caninum* cepa Liverpool contiene 11 repetidos de la secuencia HQEAVEKA-VAEERKKLEEERKTWKQQEDEREK en los residuos 136-167, 169-200, 202-233, 235-266, 268-299, 301-332, 334-365, 367-398, 400-43, 433-463 y 464-493.

Las secuencias de tricohialinas de diferentes organismos se compararon por medio de un alineamiento múltiple de secuencias con el programa MUSCLE, pero sólo con la sección del dominio PTZ00121 previamente obtenida en la base de datos CDD del NCBI. Se alinearon los dominios PTZ00121 de la tricohialina putativa A, tricohialina like de *T. gondii*, tricohialina putativa de *Entamoeba histolytica* (clave de acceso XP_001913756.1), tricohialina de *Trypanosoma cruzi* (clave de acceso RNF24227.1), tricohialina de *Homo sapiens* (clave de acceso NP_009044.2), tricohialina putativa de *Neospora caninum* (clave de acceso XP_003882019.1) y los dos dominios PTZ00121 de la tricohialina putativa en *Hammondia hammondi* clave de acceso XP_008884399.1. En la Figura 15 algunos aminoácidos que son conservados y que presentan similitud e identidad en cada una de las secuencias de las tricohialinas. También se hizo un alineamiento múltiple con el programa Clustal Omega el cual no se alinea con ninguna secuencia (resultado no mostrado).

Tricohialina/1- 1 MVNQNVG**E**NIRKVVYWGKTRG**F****E**DARVLRLEKEAHARVDVVLRLVGGFPPIAVQIQ**F****E**R**E**
 Entamoeba_histo 1 ERKRRE**E**QDKINKVVAEKRA**K****E****E****E**RRKK**Q****Q****E**LEQQ**Q****K****I****K****A**KEKE**K**EYNSLLE**E****K****R****O**
 Trypanosoma_cru 1 IKEEARL**E**R**I**A**E**E**K**MREVR**E**M**H****E****E**Q**V**RR**W****Q****E****E**VAA**K**T**I****Q****N****Q****E****L****R****A****O****I****E****L****K****R****L****O****E**
 Homo_sapiens/1- 1 DRKFRE**E****L****R****H****O****E****Q****G****R****K****F****L****E****E****O****R****L****R****R****O****E****R****R****K****F****L****K****E****Q****L****R****C****O****R****E****Q****L****R****D****R****D****R****K****F****R****E**
 Neospora_caninu 1 EKLRKAN**O**EN**G**D**L**E**L**R**L**E**A**L**V**D**K****A**A**V**R**E**V**T**A**A**M**E****K**A**D****E****T**E**I****V****M****F****S****O****S****G****E****F****S****D****E****D****E**
 Tricohialina_B/ 1 K**M****E****Q****E****R****E****W****O****K****H****R****A****E****E****K****G****O****E****A****I****E****K****A****V****E****E****R****K****M****E****Q****E****R****E****W****O****K****H****R****A****E****E****K****G****O****E****A****I****E****K**
 Hammondia_hammo 1 **Q****R****T****T****E****R****L****S****O****R****K****L****A****E****I****L****O****D****E****R****R****S****T****E****R****L****K****A****A****T****E****A****V****A****D****L****O****K****L****S****L****T****Q****O****R****A****E****E****R****D****A****L****R****A****V**
 Hammondia_hammo 1 **R****T****T****E****Y****E****A****A****T****K****R****V****T****E****L****E****R****L****V****R****E****O****E****K****N****S****M****L****E****T****T****L****E****K****K****E****E****A****L****K****K****E****V****E****E****K****R****A****L****V****K****E****V**

Tricohialina/1- 61 **R****K****L****H****F****L****A****S****R****N****W****G****A****E****V****H****R****I****C****L****S****I****A****C****T****L****K****P****A****S****P****T****L****R****R****S****V****S****P****I****S****R****S****P****L****C****S****P****V****F****A****V****L****I****L****F**
 Entamoeba_histo 61 **K****I****V****G****E****Q****M****K****L****E****E****K****H****A****E****E****R****K****M****L****E****K****L****K****Q****A****O****E****S****A****G****I****T****A****V****E****H****L****N****N****A****Q****L****V****E****E****K****L****N****D****E****S****E****Q**
 Trypanosoma_cru 61 **Q****K****T****K****E****A****E****Q****E****S****K****S****V****G****A****P****R****D****P****N****D****R****D****D****G****A****N****A****V****M****V****E****R****R****O****L****T****E****N****O****R****R****I****R****E****R****A****V****Q****L****R****R****L****E****Q**
 Homo_sapiens/1- 61 **E****Q****Q****L****S****R****O****E****R****D****R****K****F****R****E****E****Q****V****R****R****O****E****R****E****R****K****F****L****E****E****Q****L****R****O****E****R****H****R****K****F****R****E****E****Q****L****L****E****R****E****Q****L**
 Neospora_caninu 61 **G****L****O****P****S****S****V****I****R****R****K****L****R****I****E****K****L****E****G****E****V****K****T****E****A****A****V****H****D****L****E****E****K****V****N****T****L****L****A****S****Q****S****A****A****T****E****N****L****A****A****K****E****E****L****A****E**
 Tricohialina_B/ 61 **A****V****E****E****R****K****M****E****Q****E****R****E****W****O****K****H****R****A****E****E****K****G****O****E****A****I****E****K****A****V****E****E****R****K****M****E****Q****E****R****E****W****O****K****H****R****A****E****E****K****G****O**
 Hammondia_hammo 61 **R****E****Q****T****A****E****A****T****K****A****A****L****A****A****Q****L****E****T****D****L****E****L****T****R****S****L****L****O****T****A****L****T****A****A****A****A****A****Q****A****V****E****A****T****E****G****E****E****A****K****O****M****K****L****O****T**
 Hammondia_hammo 61 **R****L****T****T****Q****A****E****V****A****D****Y****K****E****V****T****E****K****L****K****A****H****R****E****N****G****D****L****E****R****L****G****A****L****A****D****E****K****D****A****V****R****E****A****V****E****K****A****O****E****V****R****H**

Tricohialina/1- 121 **F****L****F****F****K****F****L****S****P****I****W****F****V****F****S****D****L****P****I****V****L****F****A****F****L****A****F****F****S****L****L****L****M****V****L****O****S****S****C****S****H****H****E****T****V****E****S****P****A****G****L****R****P**
 Entamoeba_histo 121 **I****K****Q****D****I****D****E****A****Y****K****R****K****O****T****R****F****E****M****L****R****L****O****S****D****N****I****R****N****E****K****E****F****O****K****E****A****D****R****K****K****O****E****M****L****K****K****E****K****R****M****E****E****R****I****Q****N**
 Trypanosoma_cru 121 **E****A****A****K****S****L****F****O****R****L****A****Q****D****V****R****E****V****F****H****L****N****L****S****V****V****A****S****E****K****E****R****L****I****D****R****Y****R****K****E****R****E****A****K****D****R****E****E****L****E****R****O****E****M****O****K**
 Homo_sapiens/1- 121 **H****R****Q****E****R****D****R****K****F****L****E****E****Q****L****R****R****O****E****R****D****R****K****F****R****O****E****L****S****R****O****E****P****R****K****F****L****E****E****Q****L****L****O****R****O****R****K****F****L****O****E****Q**
 Neospora_caninu 121 **Q****R****N****E****Q****L****O****R****D****L****D****A****H****R****K****E****E****K****K****S****V****E****A****L****E****K****E****N****C****A****L****O****R****N****L****A****O****L****A****D****E****G****T****K****A****D****A****E****A****K****L**
 Tricohialina_B/ 121 **Q****E****A****I****Q****R****A****V****E****E****R****N****K****M****E****Q****E****R****O****W****O****K****R****O****E****R****E****K****E****R****D****G****E****M****E****Q****L****O****R****A****N****D****E****N****E****T****A****R****K****V****T****E**
 Hammondia_hammo 121 **R****I****L****R****L****E****E****K****G****V****L****E****A****T****L****S****E****K****K****K****M****E****E****R****N****A****N****K****Q****O****E****R****O****E****K****O****E****A****I****E****K****A****I****E****A****R****K****K****M****E****E**
 Hammondia_hammo 121 **L****E****V****E****L****R****R****K****E****T****E****I****V****M****F****S****R****S****A****W****S****E****E****N****E****T****N****E****E****T****N****E****E****K****S****S****H****P****A****A****V****I****R****K****L****R****I****N****R****L****E****E****V**

Tricohialina/1- 181 **P****H****N****O****S****L****E****G****Q****V****S****S****R****D****R****R****O****G****G****R****R****G****D****S****L****G****R****R****T****G****R****P****R****H****S****L****S****V****K****T****I****L****S****P****N****O****Q****R****S****P****H****A****S****R****P****Y****C****A**
 Entamoeba_histo 181 **L****H****Y****E****L****S****E****K****Y****T****S****K****V****D****E****N****Y****K****L****S****G****E****V****H****D****M****E****O****K****K****A****E****L****T****D****L****L****O****K****E****R****O****T****K****R****V****N****S****L****I****D****D****V****S****O****E****I****L**
 Trypanosoma_cru 181 **E****A****K****R****E****E****R****E****A****K****F****W****S****A****M****E****D****R****A****R****F****R****E****V****E****K****K****S****L****K****D****E****E****R****A****R****N****K****R****D****L****E****D****R****E****A****R****L****K****G****D****K****E****L****R**
 Homo_sapiens/1- 181 **Q****L****R****R****O****E****R****G****O****R****R****O****R****D****R****K****F****R****E****E****Q****L****R****O****E****R****E****Q****L****S****R****O****E****R****D****R****K****F****R****L****E****E****Q****K****V****R****Q****E****O****E****R****K****F****M**
 Neospora_caninu 181 **H****A****A****E****A****L****K****A****A****R****E****E****A****S****I****S****A****E****S****A****S****A****F****A****D****R****O****E****L****L****K****T****G****R****L****T****M****D****L****A****E****K****T****E****V****A****Q****L****O****K****L****R****L****E****K**
 Tricohialina_B/ 181 **L****E****R****L****V****R****E****E****Q****E****K****N****S****I****L****E****T****T****L****R****E****K****K****D****E****E****A****L****K****K****E****V****E****E****K****R****A****L****V****K****E****V****E****R****L****T****S****O****A****E****V****A****D****Y****K****E****V**
 Hammondia_hammo 181 **R****E****A****L****K****R****H****R****G****E****M****E****K****O****D****E****R****E****K****E****Q****E****A****I****E****K****A****I****E****E****R****K****M****E****E****R****E****L****K****R****O****D****E****R****E****K****O****E****A****I****E****K**
 Hammondia_hammo 181 **K****T****K****A****A****L****Q****D****L****E****K****L****N****T****L****L****A****S****Q****S****A****A****T****V****N****L****A****A****K****E****L****A****A****V****R****K****R****N****E****Q****L****R****D****F****D****A****L****K****E****E****E****K****P**

Tricohialina/1- 241 **K****K****P****K****C****C****E****K****G****C****S****V****G****R****L****R****O****Q****L****N****L****R****E****E****K****T****O****L****E****D****M****I****S****M****O****T****A****T****L****H****O****I****D****O****G****K****O****L****E****Q****L****S****T****E****R****L**
 Entamoeba_histo 241 **N****V****E****K****S****I****L****O****E****N****K****R****I****K****D****N****K****R****E****Q****A****R****I****O****K****I****S****D****I****O****T****Q****T****K****I****V****K****M****D****T****H****S****I****O****R****E****H****N****E****K****O****L****D****T****K****L****D**
 Trypanosoma_cru 241 **S****E****L****E****S****I****E****R****R****D****R****E****D****R****E****D****R****S****L****I****Q****T****F****L****D****L****K****R****O****Y****E****T****O****L****E****T****R****R****O****F****L****D****R****A****H****A****E****M****H****R**
 Homo_sapiens/1- 241 **E****D****E****Q****L****R****R****O****E****Q****O****L****R****O****E****R****D****R****K****F****R****E****D****E****O****L****L****O****E****R****E****E****Q****L****H****R****O****R****D****R****K****L****E****E****P****O****L****R****R****O****E****R**
 Neospora_caninu 241 **L****P****Q****T****A****E****T****L****S****V****P****P****T****N****A****T****G****D****A****L****V****D****E****N****A****R****L****R****R****I****A****T****K****D****G****L****A****E****L****O****K****L****S****A****O****E****V****K****L****R****A****S****R****A**
 Tricohialina_B/ 241 **T****E****K****L****K****V****H****O****E****N****G****D****L****E****R****L****R****E****L****A****D****E****K****E****A****A****L****R****E****A****A****A****A****V****E****K****A****O****E****V****K****D****L****A****L****R****R****K****E****T****E****I****V****M****F**
 Hammondia_hammo 241 **A****I****E****E****R****K****M****E****E****R****E****L****K****R****O****D****E****R****E****K****E****Q****E****A****I****E****K****A****I****E****E****R****K****M****E****E****R****E****L****K****R****H****R****G****E****M****E****K****E**
 Hammondia_hammo 241 **K****G****V****A****D****L****E****K****E****N****A****A****L****R****N****L****M****L****A****Q****E****R****A****D****E****E****T****K****A****A****Q****L****E****A****R****L****H****A****A****E****A****L****T****A****T****R****E****E****A****S****A****R****A****S****E****K****R**

Tricohialina/1- 301 **E****S****O****R****K****L****A****E****I****L****O****D****E****R****R****S****T****E****E****R****L****K****A****A****T****D****A****V****A****D****L****O****K****L****R****L****T****O****R****A****E****E****R****E****A****L****R****E****A****V****R****O****T****A****E****A**
 Entamoeba_histo 301 **K****I****D****D****A****N****Y****E****L****G****K****L****E****M****A****N****A****D****A****E****L****E****Q****A****A****S****E****L****D****Q****F****V****E****R****S****K****I****L****L****O****M****E****S****K****I****T****R****D****L****S****R****E****K****K****A****E****E**
 Trypanosoma_cru 301 **M****E****L****A****A****I****E****K****R****H****A****E****S****A****G****O****S****D****R****I****H****M****R****O****I****E****M****L****E****S****H****T****G****N****A****A****K****L****K****I****I****O****M****H****F****D****M****E****A****T****K****K****M****N****V****T****L****N**
 Homo_sapiens/1- 301 **Q****L****R****H****D****R****D****R****K****F****R****E****E****Q****L****L****O****E****G****E****E****Q****L****R****R****O****E****R****D****R****K****F****R****E****E****Q****L****R****R****O****E****R****E****R****K****F****E****Q****L****R****R**
 Neospora_caninu 301 **G****S****E****W****K****V****V****T****L****V****Q****T****N****A****D****L****V****T****K****L****A****K****A****E****D****L****A****A****E****R****R****A****G****T****O****O****K****E****R****E****R****M****A****Q****O****K****D****E****E****K****I****H****D****L****V****A**
 Tricohialina_B/ 301 **S****R****S****A****D****W****S**<

Tricohialina/1- 421 E K G V L E K T L S E R K K L E E E R N E W Q M H R A Q M K G K Q E A I E K A V E E R K K M E Q E R E E W Q K H R
Entamoeba_histo 421 D E I K L K S K D I D I D N K L K E I N S R R K K L G E A K G K S V A L Q T K E G I G N R P I E V L N Q R D K E I C
Trypanosoma_cru 421 G D E R R R C Q E T Q S H Y E T L R Q Q L E K D R K L M L H V S Q E R K A F E Q Q Y E F M A K K L Q A M S E L Q D E

Homo_sapiens/1- 421 V Q E A A I R A L H E E A E T R R R E A E K A A D L E A K N R D I A E I N A T H K A V D T L T K K E A E M E R A
Neospora_caninu 421 A D Q E T K A A Q L A R L H A A E A A L A A T R E E A S A R T S E K R T Q E D E E I Q R L S K E L T E A Q T Q L R E Q
Tricohialina_B/ 421 E G E E Q K R R R E R E R E E E R A E K L K R T E E Y A A T K R V T E L E R L V R E Q E K N S M L E T T L R E
Hammondia_hammo 421 F Q A L Q T A A D K A T E K R E L K T S N E S L R K K V Q E A K M N A L R E A E T A R R E Q R E V K E D L E E K
Hammondia_hammo 1 R T T E Y E A A T K R V T E L E R L V R E Q E K N S M L T T L R E K K K E E A L K K E V E E E K R A L V K V E

Tricohialina/1- 481 A E E E K G Q E A I E K A V E E E R K K V E Q E R E E W Q K H R A E E E K G Q E A I E K A V E E E R K K M E Q E R E
Entamoeba_histo 481 D D I H K K Y E E E R R K K R E I A K F V E S V E K E P T P P L T E K T V L P K L V N Q E E I E R E L A D N H L Q H V
Trypanosoma_cru 481 R L A I A R E R T E A A V L R R Q N T D E M V L K S L R A R E E A Y A E K V E A I E E D R L A V K E M R C E Q K R L
Homo_sapiens/1- 481 A Q H A R E V E A S L R E S L S A A Q A R L E T E K K I V E I E S H Y R D A R A A E T Q A K D A A L A S L R S E L A S
Neospora_caninu 481 R S R T G S E W K V T T L V Q T N T E L I T K L A R V E E D L A A E R R T A G Q Q R E A Q E A L M K Q S E Q E E K L Q
Tricohialina_B/ 481 K K K E E A L K K E V E E E K R A L V K E V R L T T Q A A E V A D Y K E V T E K L K K A H R E N G D L E R L G A L
Hammondia_hammo 481 K R E L A E M R Q T H A T T V E L A K K D V A H A N E K A K E V A A L R A S L S A A E A R V V E K E K R I A E V
Hammondia_hammo 61 R L T T Q A A E V A D Y K E V T E K L K A H R E N G D L E R L G A L A D E K D A A V R E A A V A V E K A Q E V R H

Tricohialina/1- 541 E W Q K H R A E E E R G Q E A I E K V E E E R K K T E Q E R E E W Q K H R A E E E K G Q E A I K A V E E E R K K
Entamoeba_histo 541 K R F D P V L E L R K Q E V E K V K K R E N M K Q E E L D R K K I V E L S E A K V E I E K K L K E E L R I V E E F
Trypanosoma_cru 541 L D E I S A E R E A L R K E R E A F E D K K E L L R R F E D L Q L R A A E V G A T H E Q L R R E L L N K

Homo_sapiens/1- 541 L K A Q L A G A Q K K Q N A A H A E A D E K V Q Q L L A A N S G L V T E L A E K E A H L A D V K H Q L G K L E A K A A R
Neospora_caninu 541 T L V A T N A Q L V S E L A A K E A E S E A G K R L G V A E A K L L D F E A L Q T A D K E A T E K R E L Q A S N E S
Tricohialina_B/ 541 A D E K D A A V R E A A V A V E K A Q E V R H L E V E L R R K E T E I V M F S R S A E W S E E N E T N E E T N E E
Hammondia_hammo 541 E A H F R E V K G T E K Q E T A V L A L Q S E L A S L K T Q L P D A R T T Q V A Q A E A D E N V Q Q L I A A N S A L
Hammondia_hammo 121 L E V E L R R K E T E I V M F S R S A W S E E N E T N E E T N E E K S S H P A A V I R K L R I N R I N L E E E V

Tricohialina/1- 601 M E Q E R E E W Q K H R A E E E K G Q E A I E Q A V K E E R K K M E Q E R E E W Q K H R A E E E K G Q E A I E K A V
Entamoeba_histo 601 K Q K R E K W R K E K E I Y K R I Y D I V D I T D Y I K E E P V E L K G V I E N N A S E N A S L L V K W D N V K E V S
Trypanosoma_cru -----
Homo_sapiens/1- 601 C S E A V S P E S S A D E A M A R L L I T N S E L M N R L A E K E E E S T H A A Q L L A T L K S E N E M L R C R I E D R
Neospora_caninu 601 L R K K V Q E Q E L K V N A L R E A E E T A R R D Q R K A K E D L E A K A L E A E M H K T H A T T V E E L A K M D D
Tricohialina_B/ 601 E K S S H P A A V I R R K L R I N R L E E E V K T K E A A L Q D L E K L N T L L A S Q S A A T V N L A A K E E E L A
Hammondia_hammo 601 V T E L A E R E T E L A D V K R Q L G L E A K E A T H A E V R P S A S A D E A M T R L L I L N S E L T S Q L A E Q E E
Hammondia_hammo 181 K T K A A L Q D L E E K L N T L L A S Q S A A T V N L A A K E E L A A V R K R N E Q L Q R D F D A L K E E A E E K P

Tricohialina/1- 661 K E E R K K M E Q R E E W Q K H R A E V E K G Q E A I Q R A V -----
Entamoeba_histo 661 E M F K K W A I Q R N A F I D K F D S T R K D G F S R Q -----
Trypanosoma_cru -----
Homo_sapiens/1- 661 E R Q E R E D A R D E R G K N L H S E R E S E N V T A L R E H L E A R V L L A L E K E K R V Q O N L K L K R Q L A S
Neospora_caninu 661 V A G A N Q K A R V E A S L R A S L S A A E A R V V E K E K R I A E V E A H L R D S K E T E K R E Q E T A V A A L Q S
Tricohialina_B/ 661 A V R K R N E Q L Q R D F D A L K E E A E E K P K G V A D L E K E N A A L R E R N L M L A Q E R A D E T K A A Q L E A
Hammondia_hammo 661 E A R R C M Q T A T L K K E N E Q L R S A V E E L R R R R A G E E A A R T R R G T L E A D D R A E D M R V L L A A E K E
Hammondia_hammo 241 K G V A D L E K E N A A L R E R N L M L A Q E R A D E E T K A A Q L E A R L H A A E A L T A T R E E A S A R A S E K R

Tricohialina/1- -----
Entamoeba_histo -----
Trypanosoma_cru -----
Homo_sapiens/1- 721 V E E A R K K L E E E R D E A L A A W E T H Q C S T S P A P S G R R R S P E R S Q T P S E R E N V P E T G A S G D A G P
Neospora_caninu 721 E L D S L K T Q L A D A R N T Q V A Q A D A D E K -----
Tricohialina_B/ 721 R L H A A E A L T A T R E E A S A R A S E K R T Q D -----
Hammondia_hammo 721 K R I Q D T L K L K R Q L A R A E A R -----
Hammondia_hammo 301 T Q D D E E I Q R L S K E L A E A Q T Q L R E Q R S R A G S E W K V M T L V Q T N T E L I T K L A K V E E D L A A E R R

Tricohialina/1- -----
Entamoeba_histo -----
Trypanosoma_cru -----
Homo_sapiens/1- -----
Neospora_caninu 781 G V P R L A R F K R E V E R L R E A G A D I S P L E E R F L L R K M E R H P T E A E A T L A I R R A R D R K -----
Tricohialina_B/ -----
Hammondia_hammo -----
Hammondia_hammo -----
Hammondia_hammo 361 A C Q Q R E A H E A L M K Q R S E Q E E K L Q T L V A T N A Q L V S E L A A K E T E A S E A G K Q L A V A E A K L L G

```

Tricohialina/1- 421 E K G V L E K T L S E R K K L E E E R N E W Q M H R A Q M E K G K Q E A I E K A V E E R K K M E Q E R E E W Q K H R
Entamoeba_histo 421 D E I K L K S K D I D I D N K L K E I N S R R K K L G E A K G K S V A L Q T K E G I G N K P I E V L N Q R D K E I C
Trypanosoma_cru 421 G D E R R R C Q E T Q S H Y E T L R Q Q L E K D R K L M L H E V S Q E R K A F E Q Q Y E F M A K K L Q A M S E L Q D E
-----
Homo_sapiens/1-
Neospora_caninu 421 V Q E A A I R A L H E E A E T R R R E A E K A A A D L E A K N R D I A E I N A T H E K A V D T L T K K E A E M E R A
Tricohialina_B/ 421 A D Q E T K A A Q L A R L H A A E A A L A A T R E E A S A R T S E K R T Q E D E E I Q R L S K E L T E A Q T Q L R E Q
Hammondia_hammo 421 E G E E Q K R R R E R E R E E E R A E K L K R T E E Y A A T K R V T E L E R L V R E Q E K N S M L E T T L R E
Hammondia_hammo 421 F Q A L Q T A A D K A T E K R E L K T S N E S L R K K V Q E A K M N A L R E A E T A R R E Q R E V K E D L E E K
Hammondia_hammo 1 R T T E Y E A A T K R V T E L E R L V R E Q E K N S M L E T T L R E K K K E E A L K K E V E E E K R A L V K E V E
-----
Tricohialina/1- 481 A E E E K G K Q E A I E K A V E E E R K K V E Q E R E E W Q K H R A E E E K G K Q E A I E K A V E E E R K K M E Q E R E
Entamoeba_histo 481 D D I H K K Y E E E R R K K R E I A K F V E S V E K E P T P L T E K T V L P K L V N Q E E I E R E L A D N H L Q H V
Trypanosoma_cru 481 R L A I A R E R T E A A V L R E R Q N T D E M E V L K S L R A R E E A Y A E K V E A I E E D R L A V K E M R C E Q K R L
Homo_sapiens/1-
Neospora_caninu 481 A Q H A R E V E A S L R E S L S A A Q A R L E E T E K K I V E I E S H Y R D A R A A E T Q A K D A A L A S L R S E L A S
Tricohialina_B/ 481 R S R T G S E W K V T T L V Q T N T E L I T K L A R V E E D L A A E R R T A G Q Q R E A Q E A L M K Q S E Q E E K L Q
Hammondia_hammo 481 K K K E E A L K K E V E E E K R A L V K E V R L T T Q A A E V A D Y K E V T E K L K K A H R E N G D L E R L G A L
Hammondia_hammo 481 K R E L A E M R Q T H A T T V E L A K K D E V A H A N E K A K E V E A A L R A S L S A A E A R V V E K E K R I A E V
Hammondia_hammo 61 R L T T Q A A E V A D Y K E V T E K L K A H R E N G D L E R L G A L A D E K D A A V R E A A V A V E K A Q E E V R H
-----
Tricohialina/1- 541 E W Q K H R A E E E R G K Q E A I E K V E E E R K K T E Q E R E E W Q K H R A E E E K G K Q E A I E K A V E E E R K K
Entamoeba_histo 541 K R F D P V L E L R K Q E V E K V K R E N M K Q E E L D R K K I V E L S E A K V I E K K L K E E L R I V E E F
Trypanosoma_cru 541 L D E I S A E R E A L R K E R E A F E A D K K E L L R R F E D L Q L R A A E V G A T H E Q L R R E L E L N K
-----
Homo_sapiens/1-
Neospora_caninu 541 L K A Q L A G A Q K K Q N A A H A E A D E K V Q Q L L A A N S G L V T E L A E K E A H L A D V K H Q L G K L E A K A A R
Tricohialina_B/ 541 T L V A T N A Q L V S E L A A K E A E S E A G K R L G V A E A K L L D F E A L Q K T A D K E A T E K R E L Q A S N E S
Hammondia_hammo 541 A D E K D A A V R E A A V A V E K A Q E E V R H L E V E L R R K E T E I V M F S R S A E W S E E N E T N E E T N E E
Hammondia_hammo 541 E A H F R E V K G T E K Q E T A V A L Q S E L A S L K T Q L P D A R T T Q V A Q A E A D E N V Q Q L I A A N S A L
Hammondia_hammo 121 L E V E L R R K E T E I V M F S R S A E W S E E N E T N E E T N E E K S S H P A A V I R K L R L N R L E E E V
-----
Tricohialina/1- 601 M E Q E R E E W Q K H R A E E E K G K Q E A I E Q A V K E E R K K M E Q E R E E W Q K H R A E E E K G K Q E A I E K A V
Entamoeba_histo 601 K Q K R E K W R K E K E I Y K R I Y D I V D I T D Y I K E E P V E L K G V I E N N A S E N A S L L V K W D N V K E V S
Trypanosoma_cru
Homo_sapiens/1-
Neospora_caninu 601 C S E A V S P E S S A D E A M A R L L I T N S E L M N R L A E K E E E S T H A A Q L L A T L K S E N E M L R C R I E D R
Tricohialina_B/ 601 L R K K V Q E Q L K V N L R E A E E T A R R D Q R K A K E D L E A K A L E L A E M H K T H A T T V E E L A K M D D
Hammondia_hammo 601 E K S S H P A A V I R R K L R R I N R L E E E V K T K E A A L Q D L E E K L N T L L A S Q S A A T V N L A A K E E E L A
Hammondia_hammo 601 V T E L A E R E T E L A D V K R Q L G L E A K E A T H A E V R P S A S A D E A M T R L L I L N S E L S Q L A E Q E E
Hammondia_hammo 181 K T K A A L Q D L E E K L N T L L A S Q S A A T V N L A A K E E L A A V R K R N E Q L Q R D F D A L K E A E E K P
-----
Tricohialina/1- 661 K E E R K K M E Q E R E E W Q K H R A E V E K G Q Q E A I Q R A V
Entamoeba_histo 661 E M F K K W A I Q R N A F I D K F D S T R K D G F S R Q
Trypanosoma_cru
Homo_sapiens/1-
Neospora_caninu 661 E R Q E R E D A R E D E R G K N L H S E R E S E N V T A L R E H L E A R V L L A L E K E K R V Q O N L K L K R Q L A S
Tricohialina_B/ 661 V A G A N Q K A R E V E A S L R A S L S A A E A R V V E K E K R I A E V E A H L R D S K E T E K R E Q E T A V A A L Q S
Hammondia_hammo 661 A V R K R N E Q L Q R D F D A L K E A E E K P K G V A D L E K E N A A L R E R N L M L A Q E R A D E T K A A Q L E A
Hammondia_hammo 661 E A R R C M Q T A T L K K E N E Q L S A V E E L R R R A G E E A A R T R R G T L E A D D R A E M R V L L A E K E
Hammondia_hammo 241 K G V A D L E K E N A A L R E R N L M L A Q E R A D E E T K A A Q L E A R L H A A E A L T A T R E E A S A R A S E K R
-----
Tricohialina/1-
Entamoeba_histo
Trypanosoma_cru
Homo_sapiens/1-
Neospora_caninu 721 V E E A R K K L E E E R D E A L A A W E T H Q C S T S P A P S G R R R S P E R S Q T P S E R E N V P E T G A S G D A G P
Tricohialina_B/ 721 E L D S L K T Q L A D A R N T Q V A Q A D A D E K
Hammondia_hammo 721 R L H A A E A L T A T R E E A S A R A S E K R T Q D
Hammondia_hammo 721 K R I Q D T L K L K R Q L A R A E E A R
Hammondia_hammo 301 T Q D D E E I Q R L S K E L A E A Q T Q L R E Q R S R A G S E W K V M T L V Q T N T E L I T K L A K V E E D L A E R R
-----
Tricohialina/1-
Entamoeba_histo
Trypanosoma_cru
Homo_sapiens/1-
Neospora_caninu 781 G V P R L A R F K R E V E R L R E A G A D I S P L E E R F L L R K M E R H P T E A E A T L A I R R A R D R K
Tricohialina_B/
Hammondia_hammo
Hammondia_hammo
Hammondia_hammo
Hammondia_hammo 361 A C C Q Q R E A H E A L M K Q R S E Q E E K L Q T L V A T N A Q L V S E L A A K E T E A S E A G K Q L A V A E A K L L G

```

Figura 15. Alineamiento múltiple con el programa MUSCLE empleando el dominio PTZ00121 de las tricohialinas en varios organismos. Por medio de las secuencias de los dominios PTZ00121 de diferentes organismos fueron sometidos a una alineamiento múltiple de secuencias con el programa MUSCLE. A continuación, se indica a que corresponde la secuencia indicada en esta figura: Tricohialina: tricohialina putativa A de *T. gondii* clave de acceso TGGT1_242790; *Entamoeba_histolytica*: tricohialina putativa de *Entamoeba histolytica* con clave de acceso XP_001913756.1; *Trypanosoma_cruzi*: tricohialina de *Trypanosoma cruzi* clave de acceso RNF24227.1; *Homo_sapiens*: tricohialina de *Homo sapiens* clave de acceso NP_009044.2; *Neospora_caninum*: tricohialina putativa de *Neospora caninum* clave de acceso

XP_003882019.1; Tricohialina B: tricohialina like de *T. gondii*; *Hammondia_hammondi_D1* y *Hammondia_hammondi_D2*: contiene dos dominios de PTZ00121 la tricohialina putativa de *Hammondia hommondi* clave de acceso XP_008884399.1. Se marcan los aminoácidos que presentan similitud o identidad en la secuencia del dominio PTZ00121 empleando el programa BoxShade del servidor ExPASy. Entre más obscuro existe un mayor grado de similitud.

En la figura 16 se muestran dos árboles filogenéticos de las tricohialinas de diferentes organismos incluyendo la humana y de *Toxoplasma*, así como de otros *Apicomplexas* y otros protozoarios. Se usó la sección del dominio PTZ00121 a partir del alineamiento obtenido con el programa T-coffee. Los árboles filogenéticos se obtuvieron con el programa T-coffee con el método de Neighbor Joining (Figura 16A) y con el algoritmo UPGMA: Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Mean (Figura 16B). Los árboles fueron visualizados con el programa Phylogenetic tree (Newick) viewer de ETE Toolkit. No se realizó Bootstrap para calcular el árbol más probable. Sin embargo, en un futuro se podría realizar un análisis más profundo sobre su secuencia.

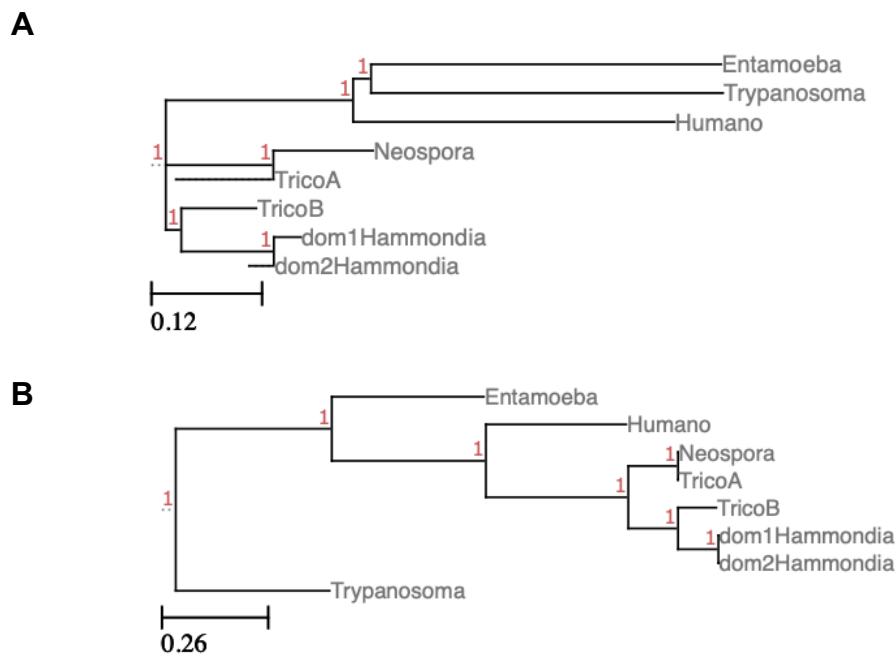


Figura 16. Árboles filogenéticos de las tricohialinas de diferentes organismos. Se construyen los árboles filogenéticos a partir del dominio PTZ00121 de la tricohialina putativa A (TricoA) y tricohialina like (TricoB) de *T. gondii*, *Entamoeba histolytica* (Entamoeba), *Trypanosoma cruzi* (Trypanosoma), *Homo sapiens* (Humano), *Neospora caninum* (Neospora) y los dos dominios de *Hammondia hammondi* (dom1Hammondia y dom2Hammondia). A. Árbol filogenético por el método de Neighbor Joining. B. Árbol filogenético con el algoritmo UPGMA (Unweighted

Pair Group Method of Arithmetic Mean). Árboles visualizados con el programa Phylogenetic tree (Newick) viewer de ETE Toolkit. La barra de escala indica el número medio de sustituciones por sitio.

8.3. Extractos de citoesqueletos subpeliculares

Una vez confirmada la expresión de los genes que codifica las tricohialinas en taquizoítos se realizó el análisis a nivel de proteína a partir del extracto de citoesqueleto subpelicular. Para ello se incubaron taquizoítos en la mezcla de PHEM-Tritón X-100 0.05% (Patrón et al., 2005), y se obtuvieron dos fases: una pastilla que corresponde al citoesqueleto subpelicular y una fracción soluble o sobrenadante. Ambos fueron empleados para separar las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% y se tiñeron con azul de Coomassie. En la Figura 17 se muestra el patrón electroforético del extracto total de taquizoítos, extracto de citoesqueletos y el sobrenadante, en donde se evidencian bandas que se encuentran tanto en el extracto total y otras exclusivas del citoesqueleto, algunas de ellas hasta enriquecidas y ausentes en el sobrenadante.

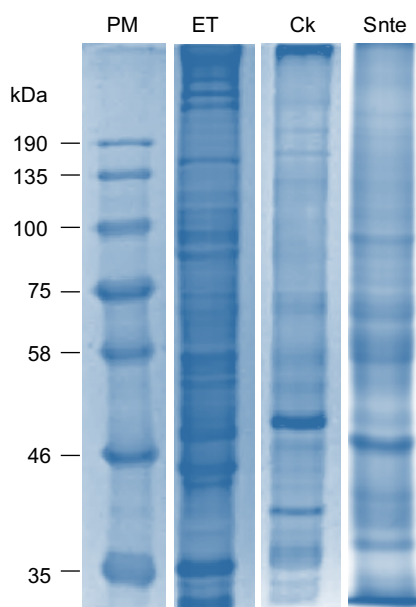


Figura 17. Patrón electroforético de extractos celulares durante la obtención del extracto de citoesqueletos subpeliculares de *T. gondii* de la cepa RH. Se cargaron 20 µg de cada uno de los extractos y sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% y se tiñó con azul de Coomassie. PM: marcador de peso molecular; ET: extracto total de taquizoítos; Ck: extracto de citoesqueleto subpelicular; Snte: sobrenadante de citoesqueletos.

8.4. Validación de citoesqueletos subpeliculares por Western blot

Para determinar el correcto aislamiento del citoesqueleto subpelicular de *T. gondii* cepa RH, se detectaron por Wb proteínas específicas de dicho extracto. En la Figura 18 se muestran los Wbs en donde se detectaron proteínas propias reportadas del citoesqueleto subpelicular como: IMC1, α -tubulina que es un componente de los microtúbulos subpeliculares y GAP45; adicionalmente, IMC1 y GAP45, que son dos proteínas que pertenecen al complejo membranal interno, también se aíslan en la fracción de citoesqueleto subpelicular. Como control negativo se detectó una proteína membranal externa, SAG1, que no se detectó en la fracción de citoesqueleto, pero sí en extracto total y en la fracción soluble (Snte), validándose así el aislamiento exitoso de las diferentes fracciones.

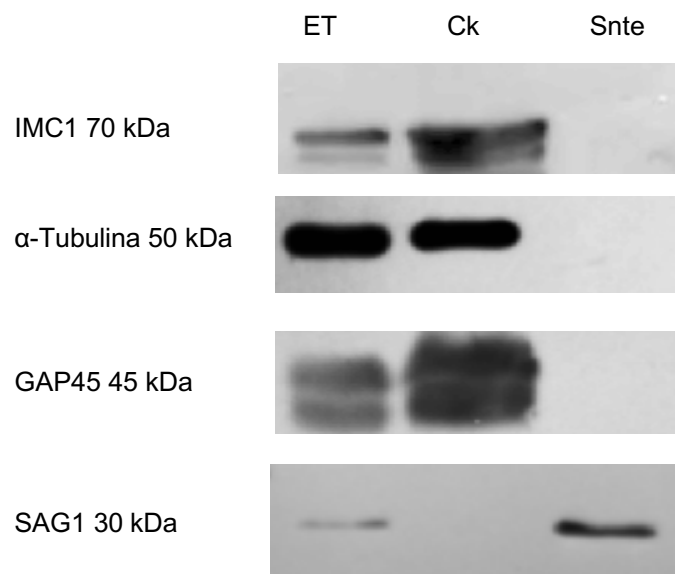


Figura 18. Validación por Western blot del aislamiento de la fracción enriquecida de citoesqueletos subpeliculares de *T. gondii*. Se cargaron 20 μ g de cada extracto en geles de poliacrilamida al 10% y se procesaron para Western blot detectado por quimioluminiscencia, detectando: IMC1, α -Tubulina, GAP45 y SAG1. ET: extracto total de taquizoítos; Ck: extracto de citoesqueleto subpelicular; Snte: sobrenadante de citoesqueletos.

8.5. Hallazgo de una nueva Red apical densa asociada al citoesqueleto subpelicular de *Toxoplasma* por microscopía electrónica de transmisión

Con el fin de validar por ultraestructura el aislamiento de citoesqueletos, se procesaron las muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET). Para este propósito se depositaron 10^3 parásitos en rejillas de níquel previamente preparadas y se aislaron los citoesqueletos como se describió en la sección de Materiales y Métodos, utilizando PHEM-Tritón X-100 y procesándose para tinción negativa y observación por MET. El análisis bajo el TEM mostró una distribución mayoritaria de citoesqueletos subpeliculares distribuidas por toda la rejilla. La ultraestructura del citoesqueleto, como se muestra en la Figura 19, se compone por el conoide (C), los microtúbulos intraconoidales (iMt) en el complejo apical y por el anillo polar apical (Ap) que tiene una función de MTOC, a través del cual se organizan los microtúbulos que se extienden por dos terceras partes la longitud del parásito y asociados subpelicularmente. Los microtúbulos (Mt) interaccionan con una red subpelicular (RdSp) de filamentos entrecruzados desde el extremo apical debajo del Ap y que se interrumpe hasta el anillo polar posterior (Figura 19A), tal y como lo reportó Gómez del León et al. (2009). Es de notarse una estructura que aunque había sido previamente detectada en preparaciones de citoesqueleto en nuestro laboratorio, esta no ha sido reportada a la fecha y que consiste en una red apical densa (RdApDs) ubicada inmediatamente por debajo del conoide y que parece estar anclada Ap (Figura 19B). RdApDs está asociada a la RdSp y aparentemente a los microtúbulos subpeliculares (Mt). Mide aproximadamente un micrómetro a lo largo del eje longitudinal del cuerpo del parásito y se distingue de la RdSp por ser mucha más densa y tener un entrecruzamiento de fibras más estrecho. Cuando se incuban los parásitos durante más tiempo con PHEM-Tritón X-100, los citoesqueletos pierden la RdSp y el anillo polar posterior; sin embargo, se conserva el conoide anclado al Ap, así como los Mt asociados al Ap y remanentes de la RdApDs (Figura 19F).

Con el fin de determinar si en parásitos completos era posible identificar morfológicamente esta zona submembranal densa que corresponde a la RdApDs, se realizaron cortes finos en ultramicrotomo de taquizoítos extracelulares, en proceso de invasión y en parásitos intracelulares (al interior de una VP) procesados para la resina Spurr. Esta es una estrategia que nos permite preservar detalles ultraestructurales de los parásitos. El análisis cuidadoso de micrografías con gran amplificación mostró en todos los casos, que en los taquizoítos efectivamente existe una zona electrodensa delgada casi imperceptible pero que se distingue del resto del

IMC y que está ubicada por debajo de la membrana plasmática de la zona apical y por debajo del conoide y asociada al IMC (Figura 20). Esta zona delgada electrodensa que muy probablemente corresponde a la RdApDs no mostró modificación en cuanto a su distribución en los taquizoítos sometidos a las diferentes condiciones evaluadas, lo cual corresponde al tipo de arreglos estructurales que presentan los citoesqueletos de soporte. Esta densidad característica, no se encontró en el IMC del resto del cuerpo del parásito en ninguno de los casos evaluados.

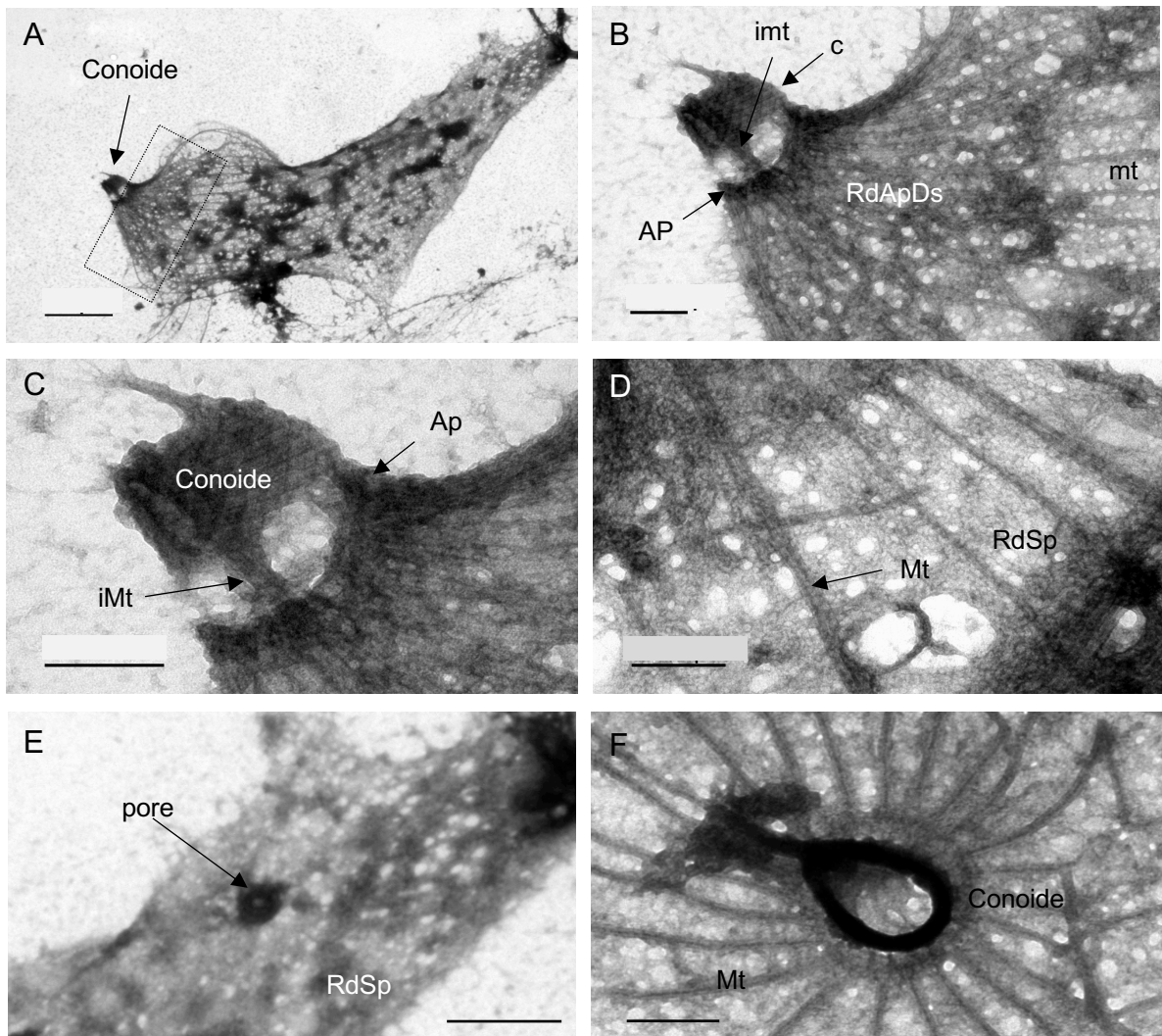


Figura 19. Ultraestructura del citoesqueleto subpellicular de *T. gondii*. A, corresponde a una micrografía de baja amplificación del citoesqueleto subpellicular de un taquizoíto. Los insertos B-E son ampliificaciones del inserto A. Insertos B y C son ampliificaciones de la región apical, en las cuales se muestra la presencia de una Red apical densa (RdApDs). El inserto D corresponde a la región de interfase entre la RdApDs, los microtúbulos y la RdSp. El inserto E

corresponde a una amplificación de la parte posterior del parásito. El inserto F es un citoesqueleto incubado durante mayor tiempo con PHEM-Tritón X-100 en donde los microtúbulos se extienden a manera de rueda de carreta. iMt: microtúbulos intraconoidales; Mt: microtúbulos subpeliculares; Ap, anillo polar o centro organizador de microtúbulos, RdSp: red subpelicular; RdApDs: Red apical densa. Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 a 80 kV. Escala en A= 1 μ m; Escalas de B-F= 200 nm.

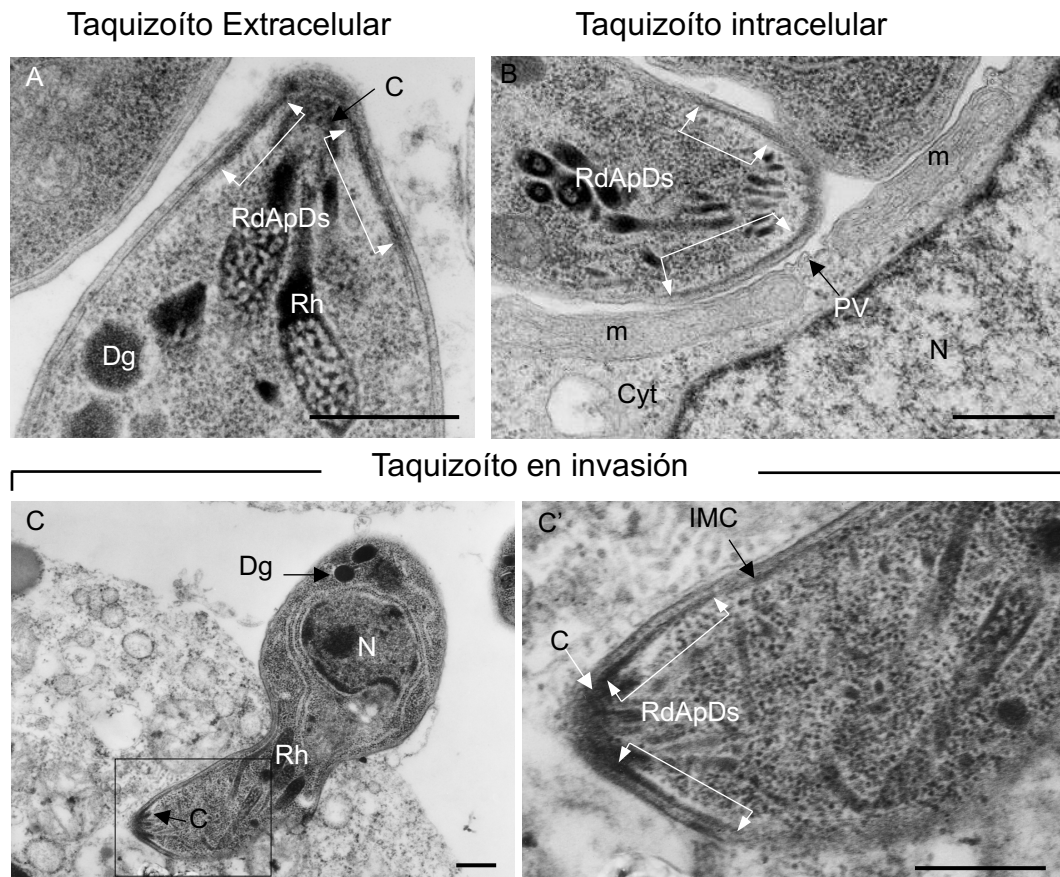


Figura 20. Detección de la Red apical densa (RdApDs) en cortes finos y por MET de taquizoitos extracelulares, en invasión celular y en ubicación intracelular. A. corresponde a una micrografía del extremo apical de un taquizoíto extracelular. B. Corresponde a una amplificación de taquizoíto intracelulares. C y C' corresponden a micrografías de baja y alta amplificación de un taquizoíto en proceso de invasión, respectivamente. La presencia de la RdApDs se indica con las dobles flechas. En todos los casos, la distribución de la RdApDs no modifica su distribución espacial. C: conoide; Dg: gránulos densos; IMC, complejo membranal interno; N: núcleo; PV: vacuola parasitófora; Rh: roptrias; m: mitocondria de la célula hospedero; Cyt: citosol de la célula hospedero; RdApDs; red apical densa. Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 a 80 kV. Escalas = 500 nm.

8.6. Identificación y cuantificación de proteínas del citoesqueleto por espectrometría de masas

Para actualizar la descripción del proteoma del citoesqueleto subpelicular reportado por Gómez de León y colaboradores (2014), se procesaron extractos de citoesqueletos de *T. gondii* para su identificación, cuantificación y análisis mediante un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters) con ionización por electrospray (ESI) y por separación de movilidad iónica (IMS). El análisis proteómico arrojó la identificación y cuantificación absoluta de 578 proteínas. Para la cuantificación se usó como control la enzima alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa ATCC 204508). Las proteínas halladas tuvieron un porcentaje de $\geq 95\%$ de confiabilidad (Protein AutoCurate green), con el software del equipo Synapt G2-Si y empleando la plataforma ToxoDB (toxodb.org, Versión 41, 13 de diciembre de 2018). Las proteínas identificadas se clasificaron en 17 categorías y además se indicó el porcentaje de cada categoría: Actina 2.07%, GRA 2.07%, proteínas de choque térmico 1.21%, Hipotéticas 26.64%, Membrana 6.05%, Metabolismo 9.34%, Micronemos 0.69%, Microtubulos 1.38%, Multifuncionales 2.42%, Núcleo 10.38%, Otras 0.69%, Proteasas 1.03%, Putativas 14.87%, Relacionados Filamentos intermedios 1.55%, Ribosomas 14.18%, Roptrías 4.32%, Unión a calcio 1.03% (Figura 21). Cabe destacar que en el extracto de citoesqueletos sólo se identificó la trichialina putativa B de 137 kDa que llamaremos como trichialina like cuyas características se muestran en la Tabla 3. En la tabla 8 (ver anexos) se muestran todas las proteínas identificadas y cuantificadas en la fracción de citoesqueleto por MS. Este resultado indica que el gen correspondiente a la trichialina like está siendo traducido a proteína en los extractos de citoesqueletos de taquizoítos de *T. gondii*.

Proteínas del citoesqueleto subpelicular de taquizoítos de *T. gondii* detectadas por Espectrometría de masas

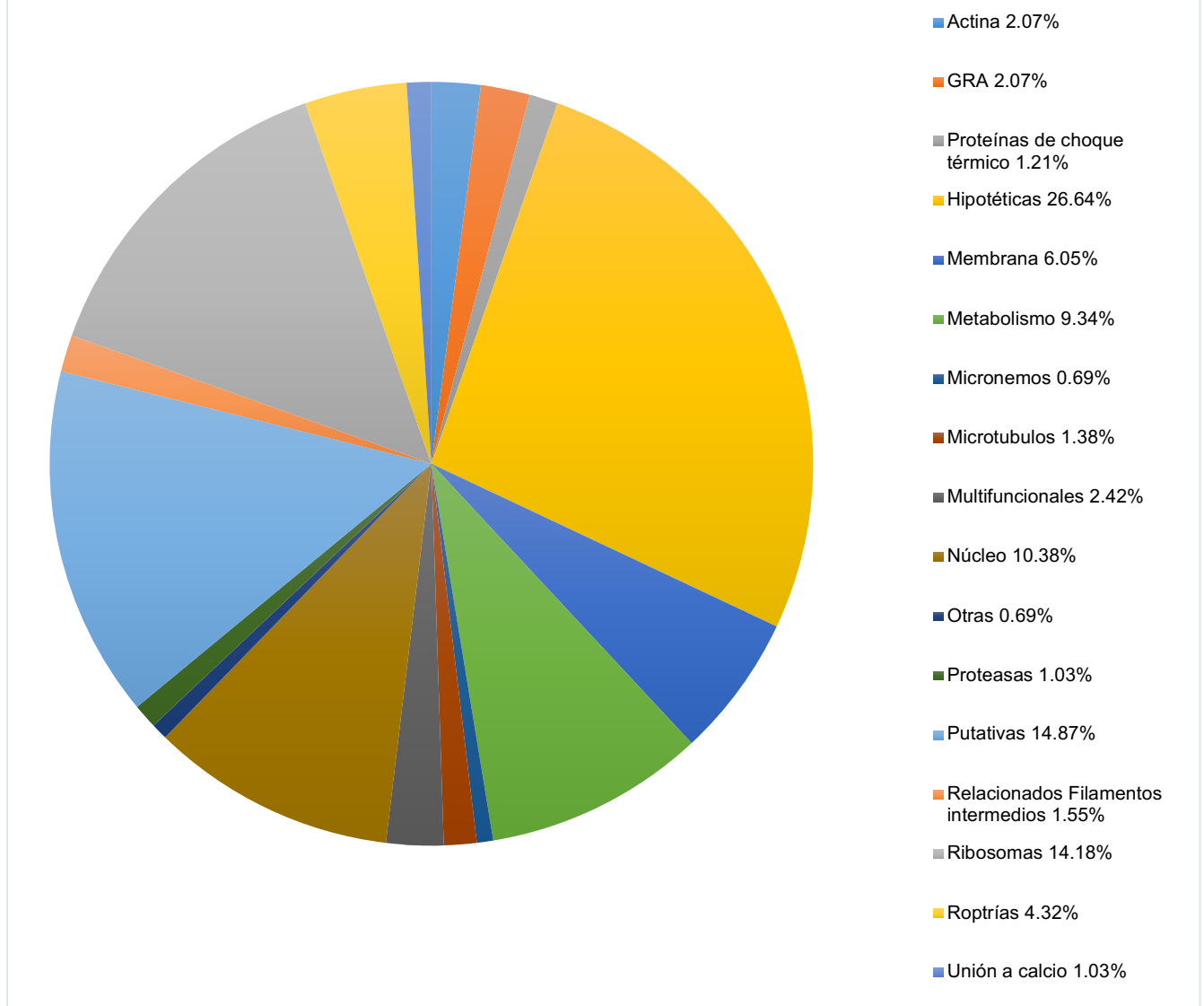


Figura 21. Clasificación de las proteínas identificadas y cuantificadas a partir del citoesqueleto subpelicular de *T. gondii* cepa RH por espectrometría de masas. A partir de los extractos de citoesqueletos se detectaron y clasificaron 578 proteínas. Todas las identificadas tuvieron un porcentaje de $\geq 95\%$ de confiabilidad (Protein AutoCurate green), con el equipo Synapt G2-Si y empleando la plataforma ToxoDB (toxodb.org, Versión 41, 13 de diciembre de 2018). Se clasificaron en 17 categorías. Se indica el porcentaje de cada una de las proteínas identificadas y agrupadas en categorías.

Tabla 3. *Datos de la identificación de la tricohialina like a partir de citoesqueletos de T. gondii cepa RH.*

Proteína identificada	Clave de identificación	Uniprot ID	Puntuación	Peso molecular (kDa)	Cantidad de proteína en columna (fmol)	Porcentaje de cobertura
Tricohialina putativa B	TGGT1_242790B	S7W0Q0	175.1517	137.83	2.5564	16.56

8.7. Identificación de la tricohialina like por inmunofluorescencia indirecta

Con el fin de determinar la distribución espacial de la tricohialina en los taquizoítos, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia indirecta usándose el anti-tricohialina comercial o los anticuerpos generados en el laboratorio anti-tricohialina like para los diversos ensayos los cuales generaron la misma marca, las figuras muestran con el anticuerpo generado en nuestro laboratorio (Figura 22). La inmunotinción de taquizoítos con el anticuerpo anti-tricohialina like se reveló con un anticuerpo secundario anti-ratón de conejo acoplado a FITC. Se utilizó como control de integridad del parásito la proteína GAP45 ya que está en el IMC y su marcaje nos daría idea que el parásito mantuvo su integridad estructural. Se usó DAPI para teñir los núcleos. Los ensayos mostraron una marca polarizada en uno de los extremos de los taquizoítos extracelulares (peritoneo de ratón infectado) (Figura 22A) y esta distribución no se modificó durante el proceso de extrusión del conoide como se muestra en taquizoítos en esta condición antes de invadir células blanco (Figura 22B). En taquizoítos en invasión la marca de tricohialina se detectó en el extremo a través del cual el parásito inició la penetración de la célula hospedero, es decir el extremo apical (Figura 22C). En taquizoítos en proliferación intravacuolar se detectó que la distribución de la marca de tricohialina corresponde a la zona apical y no al extremo posterior ya que, en las rosetas de proliferación, el extremo posterior siempre se ubica orientado hacia el interior de la roseta en el llamado cuerpo residual y los extremos apicales de cada parásito se extienden de manera radial hacia afuera de la VP (Figuras 22E y 22F). El patrón de tinción observado con el anticuerpo comercial, así como con el anticuerpo anti-tricohialina like fue el mismo, es decir en el extremo apical de los parásitos extracelulares e intracelulares.

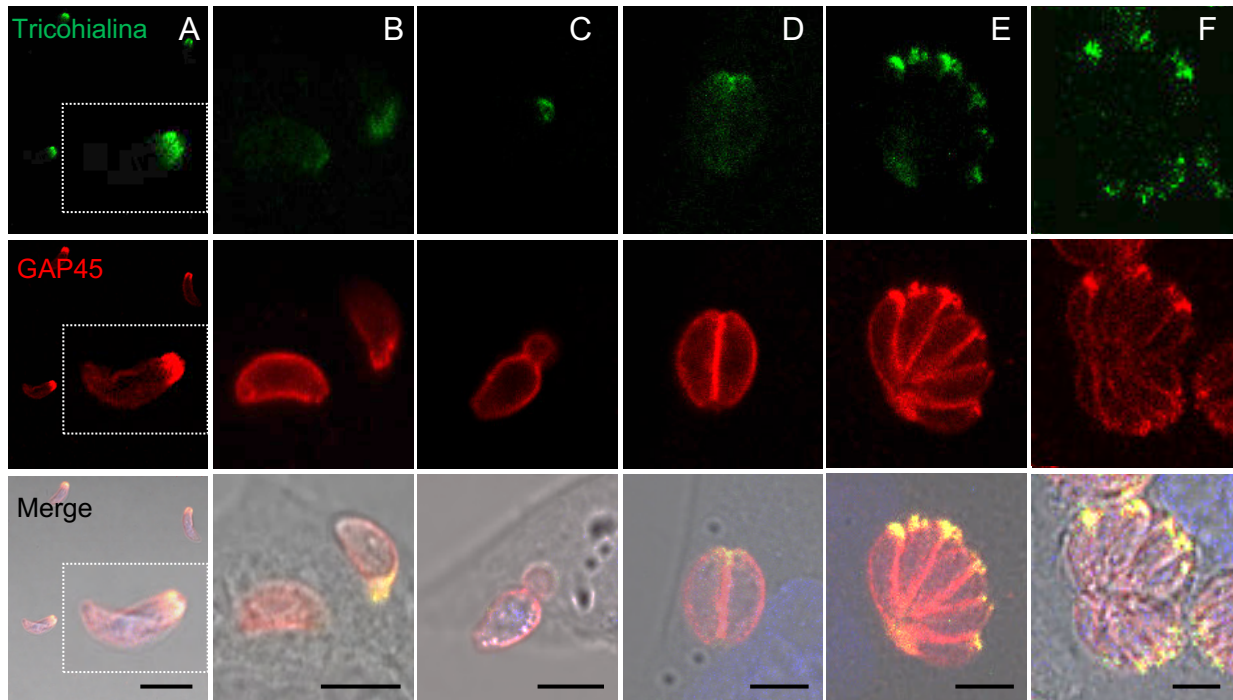


Figura 22. Distribución de la trichialina like por inmunofluorescencia indirecta. La trichialina like se muestra en verde (FITC). GAP45 se muestra en color rojo (rodamida) y DAPI en azul para tinción de ácidos nucleicos. A. Taquizoítos extracelulares. B. Taquizoíto con el conoide extruido en presencia de células HEP-2. C. Taquizoíto invadiendo a una célula HEP-2 con la típica constricción del cuerpo del parásito. D. Primera división con dos taquizoítos. E-F. Rosetas de proliferación intracelular de taquizoítos al interior de vacuolas parasitóforas con 8 y 16 taquizoítos respectivamente. Escala en A= 10 μ m; Escalas en B-F= 5 μ m.

8.8. Detección de la trichialina like por Western blot

En extractos de citoesqueletos subpeliculares y extractos totales de *T. gondii* separados en geles de poliacrilamida al 7.5% y procesados para Western blot, se llevó a cabo la detección de la trichialina like con el anticuerpo comercial y con el anticuerpo anti-trichialina like de *T. gondii*. En la figura 23 se muestran los patrones electroforéticos de extractos totales, citoesqueletos subpeliculares y sobrenadantes bajo condiciones reductoras y no reductoras. Así mismo, se revelan las bandas inmunodetectadas con el anticuerpo en los distintos extractos y usando como control positivo extracto de epitelio abdominal de ratones Balb/c. Se detectaron en el extracto de citoesqueletos dos bandas: 57 y 90 kDa (Figura 21, marcos rojos) calculados de acuerdo con la ecuación $y = x^{-4.359}$, en donde y es igual a la distancia de corrimiento en el

gel y x el peso molecular de la proteína. Estas mismas bandas se observaron también en los extractos totales de taquizoítos de RH, pero con menor intensidad. En el sobrenadante no se observaron bandas con el patrón obtenido como en el extracto total y en el extracto de citoesqueletos. El patrón de inmunoreconocimiento observado con el anticuerpo comercial, así como con el anticuerpo anti tricohialina like fue similar.

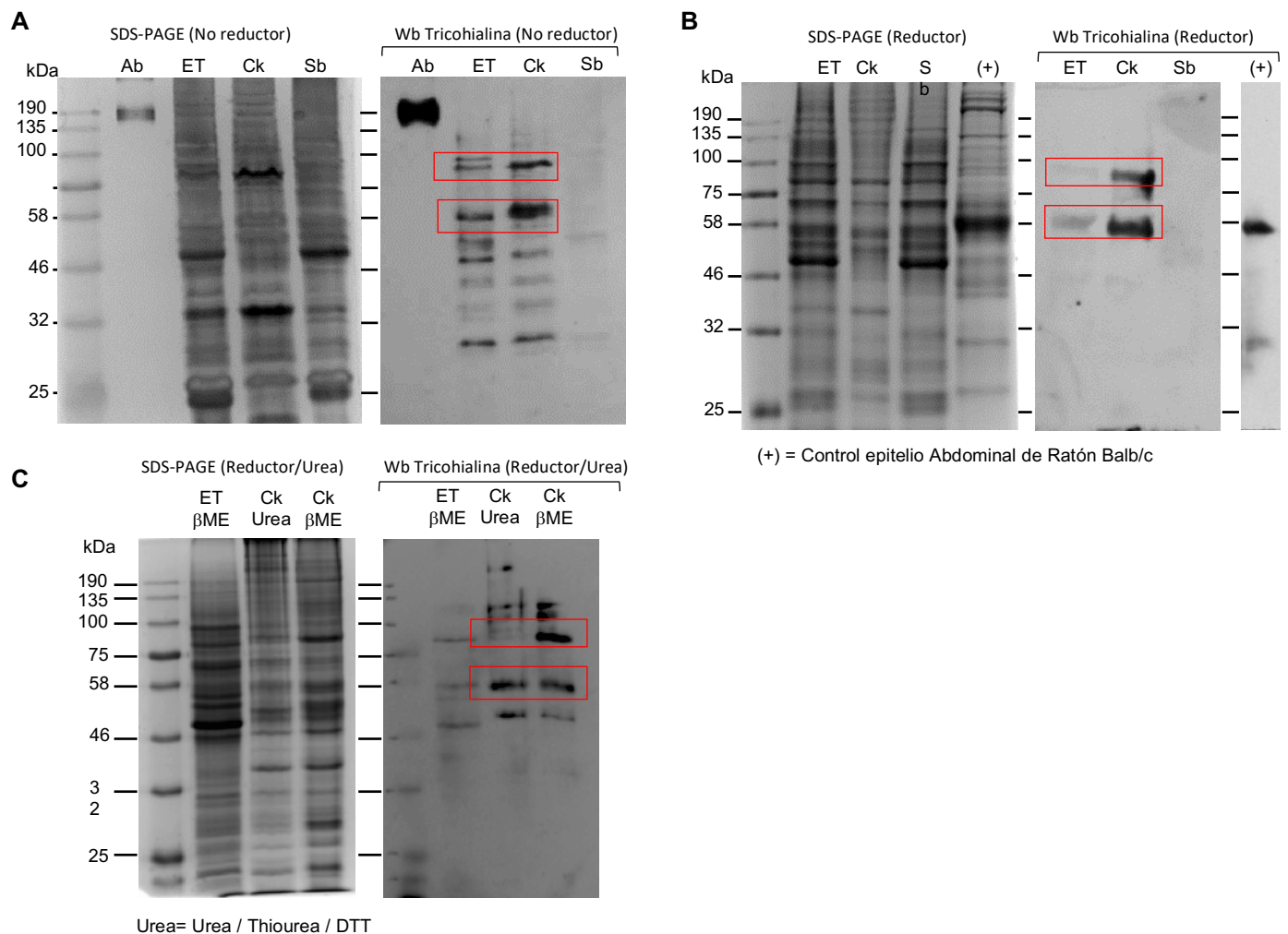


Figura 23. Identificación de la tricohialina like por electroforesis en SDS-PAGE y Western blot. De cada uno de los recuadros se muestran geles de poliacrilamida al 7.5% y teñidos con azul de Coomassie (lado derecho) y geles procesados para Western blot. A. Extractos de *Toxoplasma* disueltos en buffer bajo condiciones no reductoras, se cargó también en el gel un anticuerpo isotipo IgG como control positivo de la condición no reductora, el gel duplicado y se detectan dos bandas en el Western blot. B. Extractos proteicos disueltos en buffer de lisis con β -mercaptoetanol y DTT se corrieron en geles, como control positivo se cargó extracto de epitelio de abdomen de ratón BALB/c en el cual se expresa la tricohialina, posteriormente se

realizó Western blot. C. Extractos fueron disueltos en dos tipos de buffer el primero en presencia de urea 7 M, DTT y tiourea, el segundo buffer Urea 7 M con β -mercaptoetanol. Se identificaron 2 bandas mayoritarias y consistentes de 57 y 90 kDa (marcados con recuadro rojo). Ab: anticuerpo anti-tricohialina; ET: extracto total; Ck; citoesqueleto, Sb: sobrenadante del citoesqueleto o fracción soluble; β ME: extracto disuelto en Urea con β -mercaptoetanol; Urea: extracto disuelto en Urea con DTT y tiourea.

8.9. Análisis inmunoproteómico de tricohialina en geles de 2 dimensiones.

Con el fin de detectar proteínas únicas reconocidas por el anticuerpo anti tricohialina, se procesaron extractos de citoesqueletos subpeliculares para obtener dos geles bidimensionales, la primera dimensión fue en tiras de isoelectroenfoque en un intervalo de 3-10 de pH y la segunda dimensión en geles de 10% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie (Figura 24A) y el otro gel fue procesado para Western blot empleando el anticuerpo policlonal anti-tricohialina like (Figura 24B). En el Western blot se detectó un spot de 57 kDa con un pI de 7.3. El spot esperado para la banda de 90 kDa no fue detectado muy probablemente porque la afinidad fue mayor para la molécula de 57 kDa.

El spot del gel bidimensional de poliacrilamida se cortó y se procesó para su identificación por espectrometría de masas. En la tabla 4 se muestran las 12 proteínas identificadas en el spot correspondiente a la proteína de 57 kDa del gel bidimensional inmunoreconocida. Así mismo, se muestran los datos de un alineamiento local entre el péptido que se usó para inmunizar contra las proteínas identificadas. Por otro lado, cabe destacar que no se detectó la proteína de interés posiblemente por un enmascaramiento con otras proteínas o por que la tricohialina like se encuentra en muy baja cantidad.

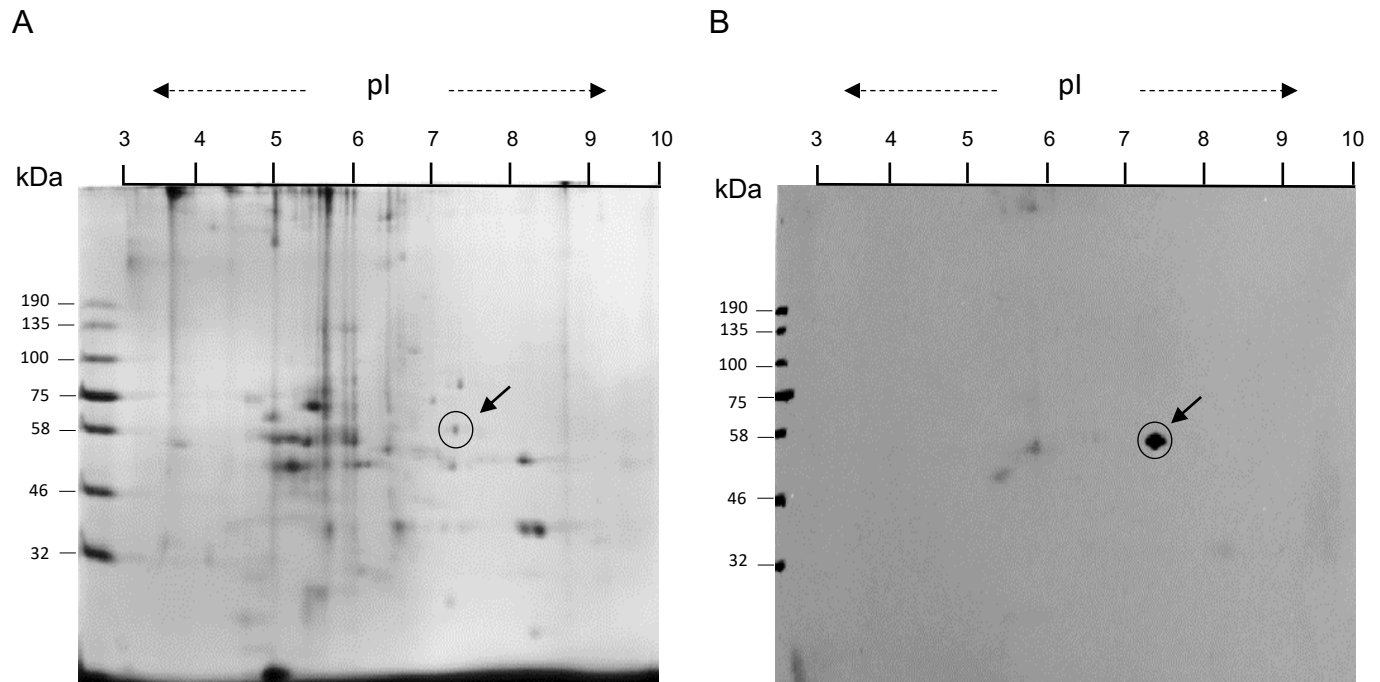


Figura 24. Electroforesis en gel bidimensional y Western blot. A. La fracción del citoesqueleto subpelicular se separó en electroforesis de dos dimensiones y el gel se tiñó con azul de Coomassie. B. Las proteínas separadas en un gel bidimensional duplicado de A, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó con leche al 6% en TBS-T y se incubó con el anticuerpo anti-tricohialina comercial. Los spot indicados por círculos y flechas corresponde a la proteína inmunoreconocida por el anticuerpo.

Tabla 4. *Proteínas identificadas por espectrometría de masas en el spot de 57 kDa del gel bidimensional y que correspondió con el spot inmunoreconocido con el anticuerpo anti-tricohialina.*

ID Toxo DB	ID UniProt	Proteína	pI	Peso molecular (kDa)	Péptidos emparejados	Porcentaje de cobertura (%)	BLAST Epítotope		
							Cober-tura	Iden-tidad	Positi-vas
TGGT1_239260	A0A125YHU3	Histone H4	11.91	11.4	3	18.45	20%	6/21	9/21
TGGT1_215590	A0A125YLN0	Flavopro-tein subunit of succinate dehydrogenase	8.27	72.7	29	35.57	1%	4/9	6/9
TGGT1_320210	A0A125YIX6	WD do-main, G-	7.5	56	15	40.97	0	0	0

TGGT1_411760	S7VNC9	beta repeat domain containing protein Actin	5.95	32.0	5	19.16	1%	2/5	4/5
TGGT1_294800A	S7UIZ8	Putative elongation factor 1-alpha (EF-1-ALPHA)	8.42	36.4	3	8.73	0	0	0
TGGT1_261240	A0A125YSM0	Histone H3	11.83	15.4	2	14.71	11%	6/15	8/15
TGGT1_220950	S7ULI1	Hypothetical protein	4.92	35.6	3	11.08	0	0	0
TGGT1_202680	A0A125YN38	Putative peptidase M16, alpha subunit	8.45	62.16	7	17.05	3%	7/20	9/20
TGGT1_289750	A0A125YNY4	Ribosomal-ubiquitin protein RPL40	10.48	14.68	2	13.95	0	0	0
TGGT1_273760	A0A125YP12	Heat shock protein HSP70	4.82	72.29	2	4.35	0	0	0
TGGT1_305980	S7UIE0	Pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E3I	7.56	66.77	5	10.66	0	0	0
TGGT1_218900	S7V1P1	Hypothetical protein	9.37	101.2	4	4.34	1%	6/10	7/10

8.10. Detección ultraestructural de la tricohialina like en parásitos completos

Se determinó la localización ultraestructural de la tricohialina like a partir de parásitos completos utilizando el anticuerpo comercial contra tricohialina humana, así como con los anticuerpos contra la tricohialina like. Para ello, los parásitos fueron colocados en resina LR-White, y los cortes obtenidos en ultramicrotomo fueron procesados para inmunotinción con oro coloidal. Como anticuerpo primario se usó la anti-tricohialina comercial de chivo o el anticuerpo anti-IgG

hecho en el laboratorio y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-IgG de chivo acoplado a oro coloidal de 10 nm o anti-IgG de ratón acoplado a oro coloidal de 10 nm, y posteriormente se realizó una tinción con acetato de uranilo. En la Figura 25A-C se muestra la marca de oro confinada al extremo apical de los taquizoítos. Esta marca tiene una distribución asociada al conoide *per se* y se localiza también por debajo de la membrana plasmática aparentemente asociada a la cara citosólica del IMC cercana al extremo conoidal-apical. La asociación al conoide es evidente en el inserto C (asterisco), en donde hay un conoide en corte transversal y con la marca de oro coloidal. Este inserto muestra que la distribución conoidal de la tricohialina no es continua en todo el organelo. Por otro lado, no se detectó marca reproducible y consistente en el citoplasma de los parásitos o en ningún otro organelo del parásito. La distribución de tricohialina like con el anticuerpo generado en nuestro laboratorio dio un patrón similar (datos no mostrados). Como control negativo se incubaron con suero normal de chivo o con el suero preinmune de ratón como controles de los anticuerpos comercial y generado en el laboratorio anti-tricohialina respectivamente y después con el anticuerpo secundario acoplado a oro. En estas condiciones, no se observó ninguna marca específica en los parásitos (Figura 25D-C). La distribución de la marca de oro coloidal coincide con la distribución de la RdApDs.

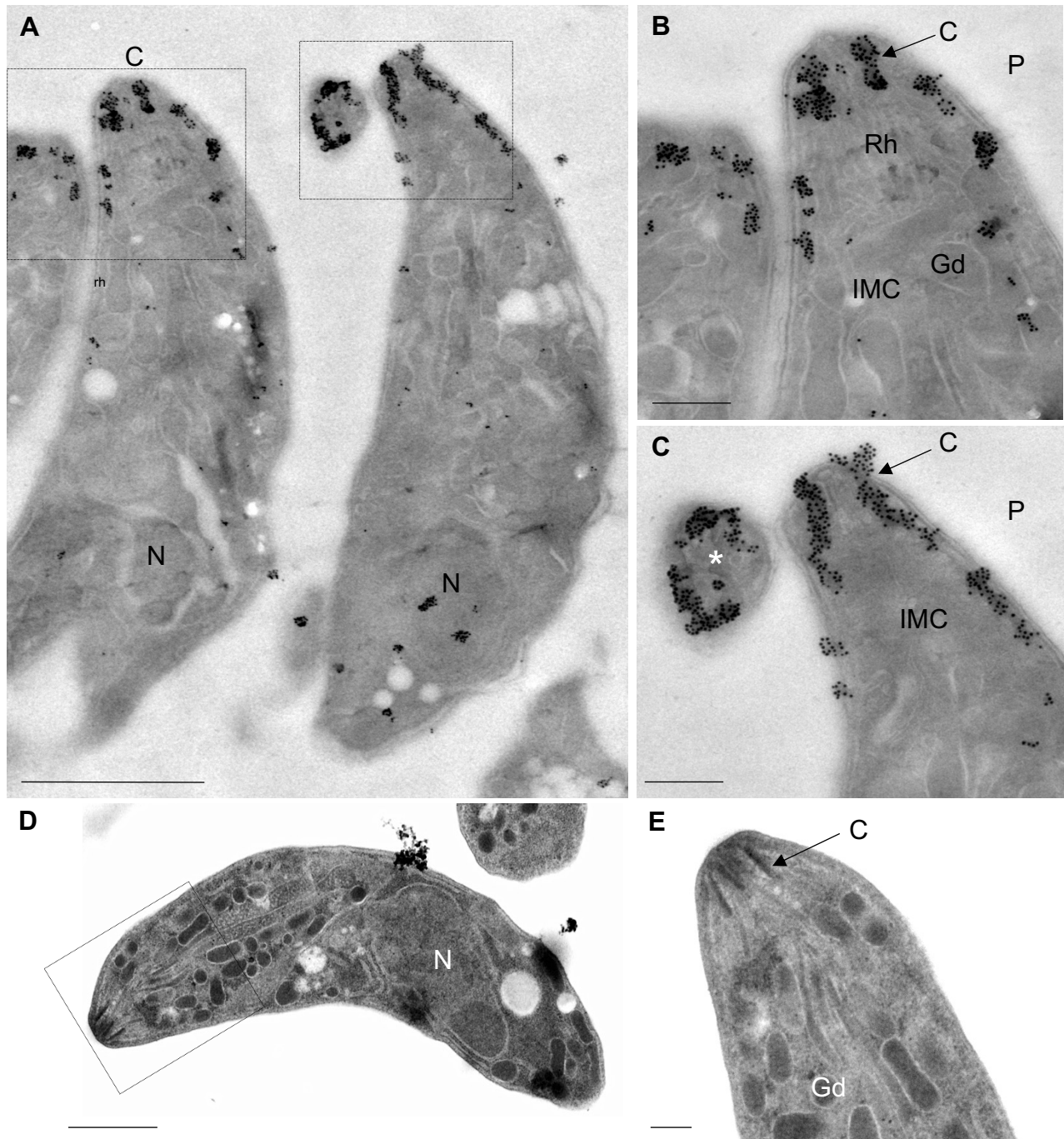


Figura 25. Distribución de tricohialina mediante inmunoelectromicroscopía (IEM) en cortes finos de taquizoítos extracelulares de *T. gondii*. A. Micrografía de baja amplificación de dos taquizoítos procesados para IEM con el anticuerpo anti-tricohialina comercial. Insertos B y C corresponden a amplificaciones de las zonas indicadas por recuadros en A. Insertos D y E corresponden a micrografías de baja y alta amplificación de un mismo taquizoíto considerados como control negativo y que solo fueron incubados con un suero de chivo normal revelado con el segundo anticuerpo acoplado a oro coloidal de 10 nm. El asterisco en el cuadro C muestra

un conoide cortado en forma transversal y conserva la marca de oro coloidal. C: conoide; Gd: gránulos densos; N: núcleo; P: películo; Rh: roptrias. Escalas en A y D = 1 μ m; Escalas en B-E = 200 nm. Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 a 80 kV.

8.11. Distribución de tricohialina en el citoesqueleto subpelicular de *T. gondii*

Con la finalidad de determinar si la tricohialina estaba asociada a la fracción del citoesqueleto y qué distribución ultraestructural presentaba, se obtuvieron citoesqueletos subpeliculares de taquizoítos y se depositaron en rejillas de níquel. Los citoesqueletos fueron procesados por IEM *in situ* para detectar la tricohialina, empleando los mismos anticuerpos del ensayo anterior y revelando la localización con oro coloidal. Como se puede observar en la Figura 26A-C, la marca se encontró específicamente distribuida en la RdApDs (estructura descrita en la Figura 19) y en el conoide (Figura 26D). Con relación a la marca detectada en el conoide hay dos posibilidades, a) que se deba a que la misma RdApDs podría estar envolviendo al conoide por su parte externa y de ahí presentar la marca de oro coloidal y/o b) que el conoide mismo contenga a la tricohialina como parte de su composición molecular. Esto sólo podría esclarecerse mediante fraccionamiento de citoesqueletos y purificación de conoides. Cuando el procedimiento de extracción con tritón X-100 se extiende 1 min más, se pierde la red subpelicular y permanece el conoide asociado al anillo polar a través de fibras de anclaje (ya detectadas en nuestro laboratorio, pero no reportadas) y los microtúbulos subpeliculares se abren a manera de las varillas de una rueda de carreta (Figura 26E). En esta condición la marca de tricohialina solo se detectó en un material remanente de la EdApDs (cabezas de flecha) que no se eliminó por completo después del tratamiento con el detergente. Aparentemente, las fibras de anclaje entre el conoide y el anillo polar apical no se encontraron decoradas con el oro coloidal indicando que en estas estructuras no hay tricohialina. Hasta el momento queda claro que la RdApDs está formada al menos por tricohialina organizada en una red característica con una distribución muy localizada al extremo apical del parásito, así como en el conoide.

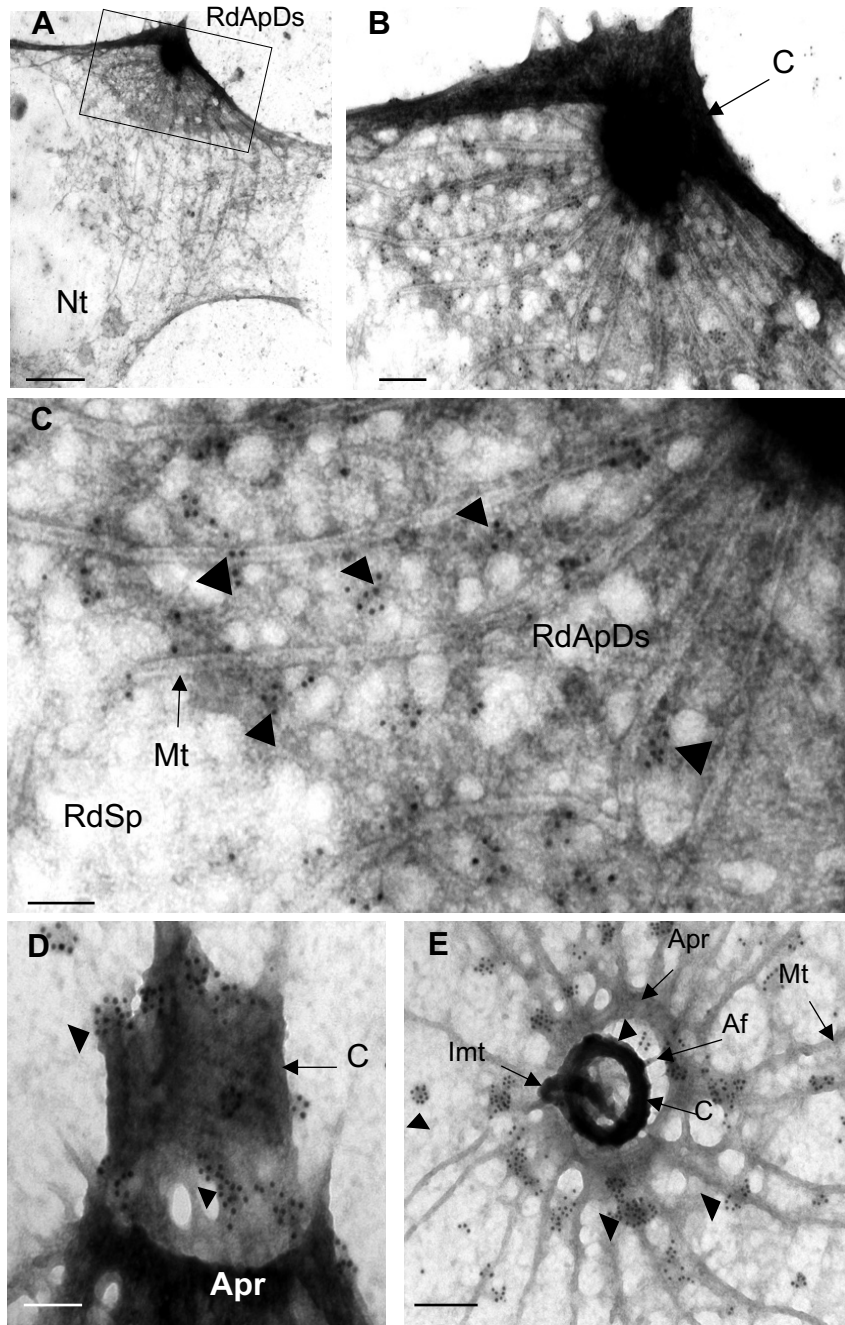


Figura 26. Distribución de trichialina en el citoesqueleto subpelicular de taquizoítos de *T. gondii*. A-C corresponden a micrografías de baja, mediana y alta amplificación de un citoesqueleto subpelicular aislado de un taquizoíto de *T. gondii*. Los cuadros indican las zonas de amplificación correspondiente. Inserto D corresponde a un amplificación del conoide inmunodecorado indicadas con la cabeza de flecha. El inserto E corresponde a un citoesqueleto sobreexposto a tritón X-100 y en el cual se pierde la red subpelicular permaneciendo los microtúbulos subpeliculares en una conformación abierta en forma de rueda de carreta con el conoide en el centro y con remanentes de la RdApDs indicadas por cabezas de flecha. Af: fibras

de anclaje; C, conoide; RdApDs, Red apical densa; Mt, microtúbulos; RdSp: red subpelicular; lmt, microtúbulos intraconoidales. Apr: anillo polar apical. Marca de oro coloidal de 10 nm. Escala en A= 1 μ m; Escala en B= 200 nm; Escalas en C-E = 100 nm. Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 a 80kV.

8.12. Inmunoprecipitación de la tricohialina like

Para determinar las proteínas con las cuales presentan interacciones directas e indirectas con la tricohialina like, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación empleando extracto de citoesqueletos con el anticuerpo anti-tricohialina like producido en el laboratorio, y su posterior detección y análisis, por espectrometría de masas. Se encontraron 144 proteínas en el inmunoprecipitado (Figura 27), las cuales se clasificaron de la siguiente manera (se menciona su porcentaje de cada una de ellas): Actina 4.86%, GRA 1.38%, Proteínas de choque térmico 2.08%, Hipotéticas 19.44%, Membrana 2.77%, Metabolismo 6.25%, Microtúbulos 2.77%, Multifuncionales 2.08%, Núcleo 2.77%, otras 2.08%, Proteasas 2.77%, Putativas 11.80%, relacionada a filamentos intermedios 4.86%, Ribosomas 25% y Roptrias 9.02%.

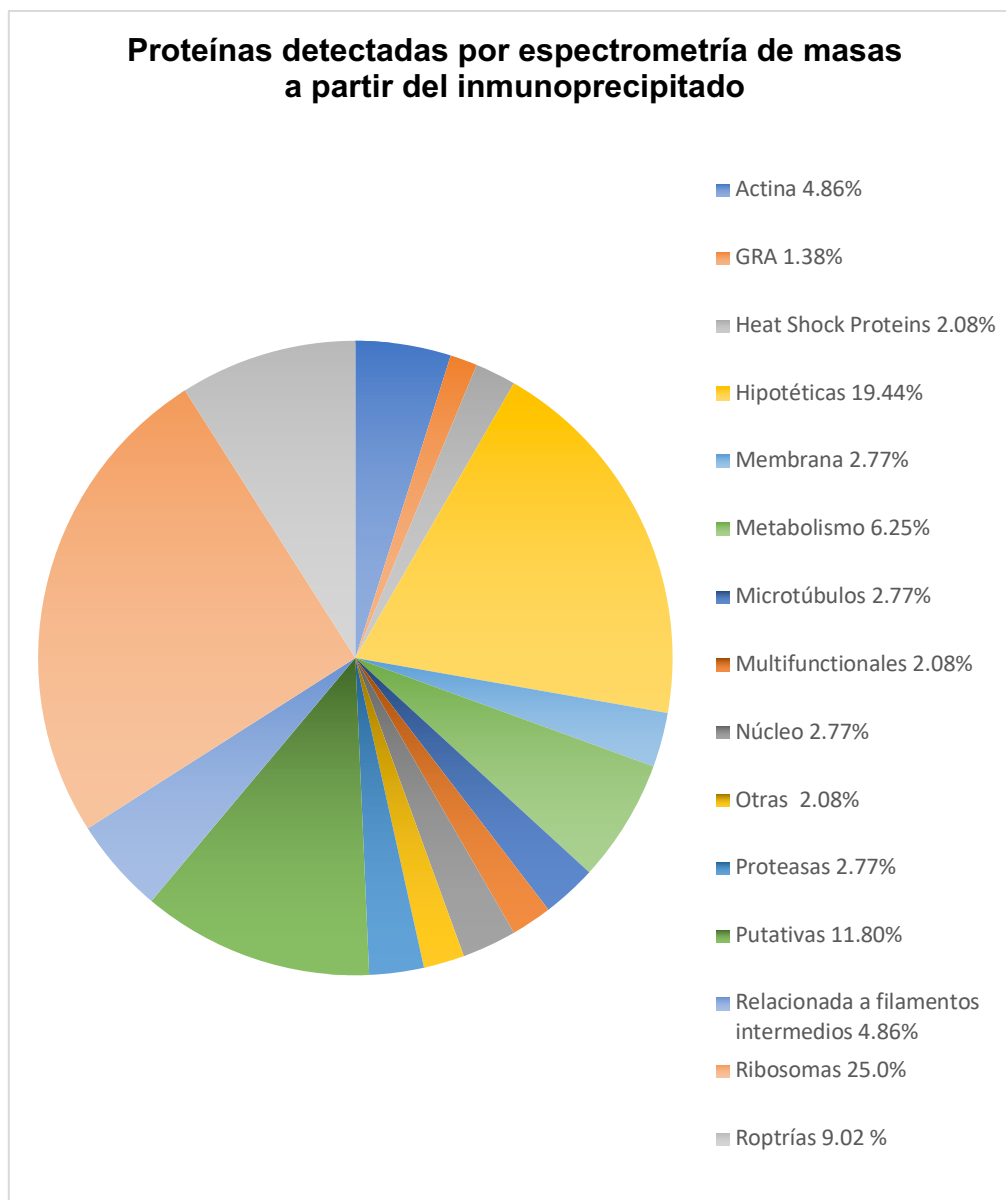


Figura 27. Clasificación de proteínas detectada por espectrometría de masas a partir de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-tricohialina. Se encontraron 145 proteínas y se determinó el porcentaje de frecuencia para cada grupo: Actina y asociadas a actina 4.86%, GRA 1.38%, Proteínas de choque térmico 2.08%, Hipotéticas 19.44%, Membrana 2.77%, Metabolismo 6.25%, Microtúbulos y asociadas a microtúbulos 2.77%, Multifuncionales 2.08%, Núcleo 2.77%, otras 2.08%, Proteasas 2.77%, Putativas 11.80%, relacionada a filamentos intermedios 4.86%, Ribosomas 25% y de Roptrías 9.02%.

Dentro de las proteínas que interaccionan con la tricohialina like es importante destacar a las alveolinas las cuales son proteínas que se han relacionado con filamentos intermedios (Tabla 5). En la figura 28 se muestra el gel del inmunoprecipitado.

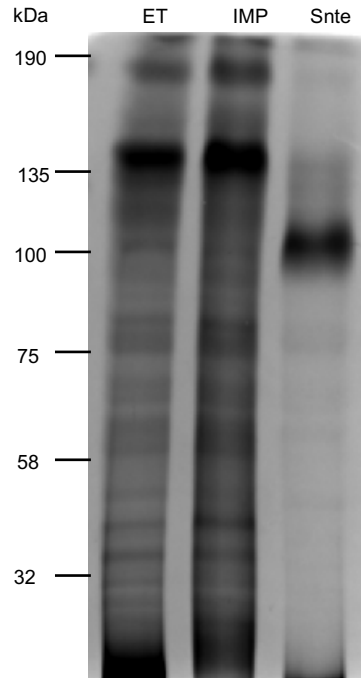


Figura 28. Gel de inmunoprecipitado tenido con azul de Coomassie. En la presente figura se muestra el patrón de corrimiento del extracto de citoesqueletos, del inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-tricohialina producido en el laboratorio y por último el sobrenadante que se genero. Ck: extracto de citoesqueletos de *T. gondii* IMP: inmunoprecipitado. Snte: sobrenadante de inmunoprecipitado o fracción no unida al anticuerpo.

Tabla 5. Proteínas relacionadas a filamentos intermedios detectadas en el inmunoprecipitado.

Clasificación	Proteína descripción	Clave de identificación	Uniprot ID	Puntuación	Peso molecular (kDa)	Porcentaje de cobertura
Relacionada a filamentos intermedios	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc7	TGGT1_222220	A0A125YVP0	2655.16	47.0122557	60.37
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc6	TGGT1_220270	S7VPD3	92.1887	48.9872141	11.26
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc14	TGGT1_260540	S7UYY7	445.4885	84.1593228	26.33
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc10	TGGT1_230210	S7WBA5	718.2719	61.4030881	22.32
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc4	TGGT1_231630	A0A125YPY9	2390.573	50.6280764	30.75
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc1	TGGT1_231640	A0A125YFV6	6123.614	70.3949062	42.36

En la Tabla 6 se enlistan cada una de las proteínas detectadas en el inmunoprecipitado. Sin embargo, no se encontró la trichialina like.

Tabla 6. *Proteínas totales detectadas en el inmunoprecipitado.*

Clasificación	Proteína descripción	Clave de identificación	Uniprot ID	Puntuación	Peso molecular (kDa)	Porcentaje de cobertura
GRA	Dense Granule Protein Gra12	TGGT1_288650	S7VY87	8397.271	48.1408617	36.24
	Dense Granule Protein Gra9	TGGT1_251540	A0A125YWK4	151.2402	35.5381232	15.41
Proteínas de choque térmico	Heat Shock Protein Hsp70	TGGT1_273760	A0A125YP12	4399.222	72.7491539	37.33
	Heat Shock Protein	TGGT1_324600	S7V3T7	6597.39	20.4373826	47.03
	Heat Shock Protein Hsp90	TGGT1_288380	A0A125YVB6	1593.522	82.3325369	34.46
Hipotéticas	Hipotética	TGGT1_293360	A0A125YR46	474.2858	26.9230216	48.15
	Hipotética	TGGT1_208830	A0A125YGU3	155.5138	55.0677659	12.48
	Hipotética	TGGT1_220950	S7ULI1	3843.807	35.6771632	31.44
	Hipotética	TGGT1_286580	S7UP07	281.377	108.0163611	9.74
	Hipotética	TGGT1_280370	S7UUK8	201.7421	82.9215689	14.85
	Hipotética	TGGT1_256030	A0A125YHL4	92.2896	29.5075743	14.84
	Hipotética	TGGT1_258470	A0A125YLP8	1491.464	31.9359107	31.69
	Hipotética	TGGT1_258870A	S7UYU8	461.0729	61.6819011	19.93
	Hipotética	TGGT1_258870B	S7W7E3	499.9633	52.3396099	18.86
	Hipotética	TGGT1_259630	S7UY65	1217.055	18.3404995	28.13
	Hipotética	TGGT1_230160	A0A125YR22	7688.71	15.9018083	46.48
	Hipotética	TGGT1_230340	S7V2D1	246.3612	103.1257408	20.55
	Hipotética	TGGT1_230850	S7V2A2	179.4877	51.1722518	12.39
	Hipotética	TGGT1_271930	S7V4M0	1165.321	26.4293898	28.21
	Hipotética	TGGT1_267500	A0A125YWB9	577.5469	25.92517	13.04
	Hipotética	TGGT1_212300	A0A125YNH9	333.3164	75.9621266	25.62
	Hipotética	TGGT1_214220	S7UR95	1428.436	23.5278821	35.38
	Hipotética	TGGT1_235340	S7URJ0	70.2819	78.5929284	12.92
	Hipotética	TGGT1_308860	S7UT19	586.8243	69.9659893	12.23
	Hipotética	TGGT1_309600	S7UT46	471.3525	107.0309889	18.33
Hipotética	TGGT1_311230	S7UU25	290.7765	499.4865862	9.39	
Hipotética	TGGT1_313380	A0A125YKB3	2915.151	32.0260399	29.2	
Hipotética	TGGT1_315750	S7W143	228.4414	25.8769704	24.24	
Hipotética	TGGT1_316340	S7ULE0	200.5525	26.9067296	16.05	

	Hipotética	TGGT1_217510	S7V1I0	103.9916	42.3998526	7.89	
	Hipotética	TGGT1_249990	S7V0P7	366.1563	93.1149708	20.17	
	Hipotética	TGGT1_278780	S7W8B0	343.9522	46.4708443	15.47	
	Hipotética	TGGT1_279100	S7UGI9	3806.821	48.1655127	37.7	
Relacionada a membrana	Apical Membrane Antigen Ama1	TGGT1_255260	S7WI53	205.1478	64.1041999	8.61	
	Eukaryotic Porin Protein	TGGT1_263300	A0A125YUJ9	216.7319	31.6370852	25.52	
	Multi-Pass Transmembrane Protein	TGGT1_267620	S7UGQ1	178.1329	58.4256485	12.2	
	Multi-Pass Transmembrane Protein	TGGT1_219270	A0A125YRY2	141.7019	43.2616273	3.08	
Metabolismo	Glucose-6-Phosphate 1-Dehydrogenase	TGGT1_294200	A0A125YWK6	1297.509	62.9646506	36.79	
	2-Oxo Acid Dehydrogenases Acyltransferase (Catalytic Domain) Domain-Containing Protein	TGGT1_319920	S7UK76	475.8388	70.9740487	17.79	
	Atp Synthase Beta Subunit Atp-B	TGGT1_261950	A0A125YYY4	541.4387	60.1447584	29.11	
	Atp Synthase Beta Subunit Atp-B	TGGT1_261950	A0A125YYY4	2595.709	60.1447584	43.04	
	Enolase 2	TGGT1_268850	TGGT1_268850	390.3513	52.7982425	15.79	
	2-Oxoglutarate/Malate Translocase Omt	TGGT1_274060	S7V4E3	401.0705	35.2999469	25.39	
	Glutathione S-Transferase_N-Terminal Domain-Containing Protein	TGGT1_306030	A0A125YIG3	267.9536	38.4015233	9.01	
	Facilitative Glucose Transporter Gt1	TGGT1_214320	A0A125YKB0	335.9012	62.4295164	10.92	
	Acid Phosphatase Gap50	TGGT1_219320	S7V1S3	1382.649	46.8340934	21.11	
	Asociadas a microtúbulos	Microtubule Associated Protein Spm2	TGGT1_286590	S7VWS9	150.9515	40.1272999	11.76
		Microtubule Associated Protein Spm1	TGGT1_263520	S7UXQ8	595.5894	39.1940324	11.11
Beta-Tubulin		TGGT1_266960	A0A125YWG4	7122.531	50.5866747	30.73	
Alpha Tubulin Tuba1		TGGT1_316400B	S7UL74	2049.773	48.5335742	23.84	
Multifuncionales	Ras Family Protein	TGGT1_257340	A0A125YZS8	244.8415	23.8090597	11.68	
	14-3-3 Protein	TGGT1_263090	A0A125YLJ3	427.7243	37.4020379	25.39	
	Chaperonin Protein Bip	TGGT1_311720	A0A125YJG4	3409.777	73.4243321	35.33	
Núcleo	Histone H4	TGGT1_239260	A0A125YHU3	5116.844	11.4394697	57.28	
	Histone H2Bb	TGGT1_251870	A0A125YW36	634.1479	12.6318498	27.83	
	Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 17	TGGT1_236650	A0A125YWJ5	662.7327	60.280407	21.27	
	Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide Ddx6	TGGT1_313010	S7W8B2	150.2005	53.9745599	24.21	
Otras	Pdi Family Protein	TGGT1_232410	A0A125YMM2	5614.434	25.0234529	48.64	
	Spfh Domain / Band 7 Family Protein	TGGT1_233100	A0A125YWW3	229.6306	32.1750724	15.52	
	Mag1 Protein	TGGT1_270240	S7V482	1824.735	49.4945657	21.24	
Proteasas	Trypsin Domain-Containing Protein	TGGT1_262920	S7UXW4	259.5892	104.6250847	14.51	
	Rhoptry Metalloprotease Toxolysin Tln1	TGGT1_269885A	S7V3X7	1358.837	142.6425993	23.32	
	Rhoptry Metalloprotease Toxolysin Tln1	TGGT1_269885B	S7V463	648.7314	63.2812206	19.35	
	Aspartyl Protease Asp3	TGGT1_246550	A0A125YUQ4	176.0449	69.8161728	9.18	

Putativas	Putative Eukaryotic Initiation Factor-3_ Subunit 8	TGGT1_294620	A0A125YXE7	184.3344	109.9341335	10.61
	Putative Elongation Factor 1-Alpha (Ef-1-Alpha)	TGGT1_294800A	S7UIZ8	898.8599	36.645122	32.53
	Putative Beta-Tubulin	TGGT1_221620	A0A125YYZ4	6883.521	50.4935749	34.52
	Putative Transmembrane Protein	TGGT1_410360	S7ULN4	5783.485	38.3072527	18.08
	Putative Prohibitin	TGGT1_243950	A0A125YRG2	1189.48	30.2788288	17.34
	Putative Heat Shock Protein 90	TGGT1_244560	S7VTT7	844.829	97.8394735	22.86
	Putative Atpase Synthase Subunit Alpha	TGGT1_204400	S7UU80	1985.002	62.6025614	14.38
	Putative Nucleolar Protein 5	TGGT1_205510	S7UUJ5	340.5739	54.4488014	28.37
	Putative Preprotein Translocase Sec61	TGGT1_269980	A0A125YSW3	375.1317	52.5637926	8.88
	Putative Acetyl-Coenzyme A Synthetase 2	TGGT1_266640	S7UHB7	113.7771	81.189048	5.88
	Putative Clathrin Heavy Chain	TGGT1_290950	A0A125YSB0	630.7567	195.9023265	20.97
	Putative Aminopeptidase N	TGGT1_224460	S7UWT6	342.4319	109.175425	18.66
	Putative Nucleolar Protein	TGGT1_247470	A0A125YGZ6	319.6782	60.4529695	15.49
	Putative Adenine Nucleotide Translocator	TGGT1_249900	A0A125YLS5	2748.846	35.4840478	36.48
	Putative Eukaryotic Initiation Factor-4A	TGGT1_250770	A0A125YLG0	2239.821	46.958695	54.85
	Putative Transmembrane Protein	TGGT1_410370	S7VU98	2554.702	47.910181	27.36
	Putative Transmembrane Protein	TGGT1_410370	S7VU98	2554.702	47.910181	27.36
	Relacionada a actina	Profilin Prf	TGGT1_293690	S7UIQ6	1308.503	18.0266137
Actin Act1		TGGT1_209030	A0A125YH17	1706.515	42.1930307	34.57
Actin Act1		TGGT1_209030	A0A125YH17	1320.733	42.1930307	31.65
Myosin H		TGGT1_243250	A0A125YQD3	75.236	171.0280939	10.51
Myosin Light Chain Mlc1		TGGT1_257680	A0A125YYD3	3378.97	24.4092349	22.07
Myosin A		TGGT1_235470	S7W634	4447.432	93.9611894	29.36
Actin		TGGT1_411760	S7VNC9	1375.719	32.4008136	31.01
Relacionada a filamentos intermedios	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament lmc7	TGGT1_222220	A0A125YVP0	2655.16	47.0122557	60.37
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament lmc6	TGGT1_220270	S7VPD3	92.1887	48.9872141	11.26
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament lmc14	TGGT1_260540	S7UY77	445.4885	84.1593228	26.33
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament lmc10	TGGT1_230210	S7WBA5	718.2719	61.4030881	22.32
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament lmc4	TGGT1_231630	A0A125YPY9	2390.573	50.6280764	30.75
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament lmc1	TGGT1_231640	A0A125YFV6	6123.614	70.3949062	42.36
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament lmc3	TGGT1_216000	A0A125YIN0	1139.119	58.1710984	16.73

Relacionado a ribosomas	Rna Recognition Motif-Containing Protein	TGGT1_321500	A0A125YP61	409.7069	51.1804664	24
	Ribosomal Protein Rps6	TGGT1_210690	A0A125YZ10	1006.862	29.0133263	20.7
	Ribosomal Protein Rpl5	TGGT1_320050	A0A125YYH7	1176.141	35.455716	13.55
	Ribosomal Protein Rpl23A	TGGT1_238010	S7W653	1867.769	18.6757915	28.14
	Ribosomal Protein Rpl36	TGGT1_238250	A0A125YHS1	1427.897	11.407607	20.79
	Ribosomal Protein Rps7	TGGT1_239100	A0A125YZ18	1545.965	22.6447059	54.08
	Ribosomal Protein Rpl22	TGGT1_239760	A0A125YT45	527.9529	15.1876743	17.29
	Ribosomal Protein Rpl8	TGGT1_204020	A0A125YV56	2230.666	28.3688193	28.08
	Rna Recognition Motif-Containing Protein	TGGT1_262620	A0A125YHM1	3575.973	31.931521	36.86
	Ribosomal Protein Rpl18A	TGGT1_262670	A0A125YSP4	2656.406	21.4442427	33.88
	Ribosomal Protein Rps16	TGGT1_263040	S7UY71	2543.717	24.3434459	19.43
	Ribosomal Protein Rpl13	TGGT1_263050	S7UXX9	494.2613	40.0244473	12.39
	Ribosomal Protein Rps14	TGGT1_263700	S7W6D1	5660.934	16.3585996	41.67
	Ribosomal Protein Rps3	TGGT1_232300	S7V3B5	1698.201	29.0368191	25.88
	Ribosomal Protein Rps3A	TGGT1_232710	A0A125YZM8	1363.584	29.8847774	30.5
	Asparaginyl-Trna Synthetase (Nob+Trna Synthetase)	TGGT1_270510	S7WKJ0	455.9541	75.8885402	19.67
	Ribosomal Protein Rpl14	TGGT1_267060	S7VPP6	622.9205	18.0491955	10.83
	Ribosomal Protein Rpl10	TGGT1_288720	A0A125YSQ3	2448.519	25.1431039	18.55
	Ribosomal Protein Rpl19	TGGT1_289530	A0A125YMW0	671.0309	22.2744273	10.16
	Ribosomal-Ubiquitin Protein Rpl40	TGGT1_289750	A0A125YNY4	997.6603	14.9703766	19.38
	Ribosomal Protein Rpl13A	TGGT1_292130	A0A125YU05	3020.66	33.1486435	26.22
	Ribosomal Protein Rps2	TGGT1_305520	A0A125YUG2	130.2187	29.6210877	17.1
	Ribosomal Protein Rps19	TGGT1_212290	S7UVX4	364.9557	35.8240261	13.42
	Ribosomal Protein Rps24	TGGT1_215460	S7UQS1	1234.668	30.5461816	15.73
	Ribosomal Protein Rps18	TGGT1_225080	A0A125YQT9	1830.598	17.83664	44.23
	Rna Recognition Motif-Containing Protein	TGGT1_236540	S7URE6	966.4436	53.1318093	15.94
	Ribosomal Protein Rpl4	TGGT1_309120	A0A125YTR1	1848.863	46.0332614	24.76
	Ribosomal Protein Rpl11	TGGT1_309820	A0A125YTH4	507.5873	20.3133424	15.43
	Ribosomal Protein Rpl27A	TGGT1_310490	A0A125YTM1	1879.99	16.4583049	17.01
	Fibrillarlin	TGGT1_311430	S7UTZ7	294.0619	32.0456624	3.63
	Ribosomal Protein Rpl6	TGGT1_313390	S7UT72	696.119	36.8702592	16.77
	Ribosomal Protein Rpl7	TGGT1_314810	A0A125YUF5	495.9102	30.1786838	18.22
	Ribosomal Protein Rps8	TGGT1_245460	S7WHE0	2015.213	23.6334102	37.07
	Ribosomal Protein Rpl21	TGGT1_245680	S7WHD1	681.0497	18.0649703	6.37
	Gtp-Binding Nuclear Protein Ran/Tc4	TGGT1_248340	S7V0L0	512.7202	26.1117945	26.64
	Ribosomal Protein Rps9	TGGT1_248480	A0A125YWF5	834.5609	21.6843047	27.66
Roptrias	Rhoptry Protein Rop4	TGGT1_295125	S7UI50	1226.706	40.4235636	16.44

Rhoptry Protein Rop18	TGGT1_205250	A0A125YQA8	506.7013	62.7416364	10.47
Rhoptry Protein Rop17	TGGT1_258580	S7W7J7	200.0589	69.3394828	10.53
Rhoptry Kinase Family Protein Rop39	TGGT1_2362050	S7UY96	466.7846	65.7299312	17.35
Rhoptry Kinase Family Protein Rop40 (Incomplete Catalytic Triad)	TGGT1_291960	S7UNX9	260.7756	58.418252	11.81
Rhoptry Neck Protein Ron8	TGGT1_306060	A0A125YNG1	153.762	330.4033668	10.84
Rhoptry Protein Rop8	TGGT1_215775	A0A125YM30	312.3138	65.6356162	10.61
Rhoptry Kinase Family Protein Rop11 (Incomplete Catalytic Triad)	TGGT1_227810	S7W5X8	633.7855	58.7208966	27.76
Rhoptry Protein Rop1	TGGT1_309590	S7W7R3	439.5251	49.7130422	5.26
Rhoptry Neck Protein Ron5	TGGT1_311470	S7W8Q7	182.6319	187.938657	14.54
Rhoptry Neck Protein Ron2	TGGT1_300100	S7UGV9	341.2611	167.1874931	14.4
Rhoptry Protein Rop8	TGGT1_363030	A0A125YM50	1085.28	64.3170673	19.61
Rhoptry Protein Rop7	TGGT1_295110	A0A125YJ16	377.171	63.6984795	17.57

8.13. Inducción de filamentos *in vitro*

Para determinar si la tricohialina like presente en el citoesqueleto subpelicular tenía la capacidad de formar estructuras en forma de filamentos o de red de acuerdo con la estructura vista al MET de la RdApDs, se aislaron las 2 bandas (58 y 90 kDa) a partir de geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y que fueron detectadas por Wb. Las bandas fueron cortadas directamente del gel de poliacrilamida y disueltas en una solución que contiene Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 0.3 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0. Los sobrenadantes fueron incubados a 37 °C, durante 2 h, para su polimerización en rejillas de níquel, y posteriormente fueron teñidos por tinción negativa para su observación y registró en un MET (Figura 29, Filamentos). Como control negativo se analizó BSA en un PAGE en las mismas condiciones, y la banda cortada se disolvió como se describió. El sobrenadante se depositó en una rejilla de níquel y se trataron de la misma manera que con las bandas cortadas. Como se puede observar en la figura 29 las dos bandas generan unos filamentos formando una red semejante al marcaje en la red apical densa. Estos filamentos tienen un grosor de 10 nm semejante al tamaño de los filamentos intermedios.

Por otro lado, las proteínas presentes eluidas a los antes descritos fueron polimerizados sobre rejillas y se procesaron para IEM usando el anti-tricohialina like producido en el laboratorio y un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm. En la Figura 29 (IEM)

se muestra cada una de las bandas inducidas a polimerizar, las cuales generan redes de aproximadamente 10 nm de diámetro y se confirma la presencia de la tricohialina en las dos bandas con el anticuerpo por Western blot. Como se puede observar, asociado a estas estructuras se presenta la marca de oro coloidal distribuida a lo largo de los filamentos de 10 nm. Estas estructuras son muy semejantes a las detectadas en los análisis de IEM en citoesqueletos de *T. gondii* previamente mostrados. Esto corrobora los resultados obtenidos a nivel ultraestructural del citoesqueleto de *T. gondii*. Como control negativo se depositó en la rejilla albúmina sérica bovina (BSA) y fue procesada para inmunoro en las mismas condiciones. Como se muestra en la figura 29 (BSA), no hay partículas de oro coloidal asociadas a los componentes proteicos.

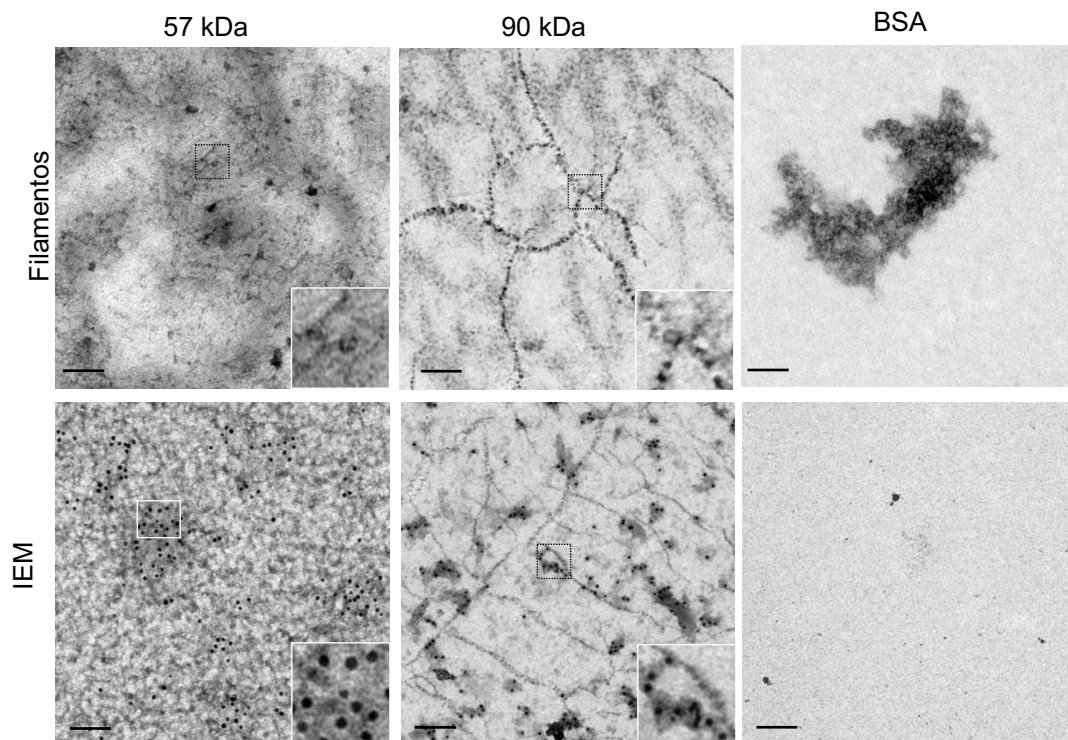


Figura 29. Reconstitución de filamentos *in vitro* con extracto de citoesqueleto subpellicular e inmunoro con anti-tricohialina like. El extracto de citoesqueleto subpellicular se corrió en SDS-PAGE y se cortaron las bandas de 57 y 90 kDa –indicadas en cada recuadro– y detectadas por Western blot en un gel pareado transferido a nitrocelulosa y revelado con el anticuerpos anti-tricohialina. Las bandas se maceraron en Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 0,3 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0 y se incubaron a 25 °C durante 2 h en rejillas de níquel, y posteriormente fueron teñidas por tinción negativa y observadas en el TEM o procesadas para IEM. Se usó BSA como control negativo para ultraestructura como para IEM. Escala =100 nm Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 a 80kV.

8.14. Efecto de fármacos que afectan al citoesqueleto en la distribución de trichialina like en el citoesqueleto subpeliclar.

Se determinó si la RdApDs conteniendo trichialina like, altera su distribución como resultado de la exposición de citoesqueleto subpeliclar a agentes despolimerizantes del citoesqueleto mediante su detección por Western blot en las fracciones solubles (sobrenadante) e insolubles (pastilla) que se generan post-tratamiento. Se incubaron extractos de citoesqueletos de *T. gondii* en presencia de 5 μ M de citocalasina D, un agente despolimerizador de filamentos de actina, y con 10 mM de colchicina, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos. Como control negativo se utilizó DMSO 56 μ M, que fue la concentración máxima utilizada en la preparación de la citocalasina D. También, se empleó un xenotóxico disruptor de filamentos intermedios, que fue la acrilamida a 15 mM. El análisis por Wb de las fracciones tratadas mostró las dos bandas previamente reconocidas de 57 y 90 kDa sin aparentes modificaciones en su corrimiento e integridad y siendo solo detectadas en la fracción insoluble del citoesqueleto (Figura 30). La ausencia de estas moléculas en las fracciones solubles indica que la RdApDs la cual está conformada por la trichialina, no se despolimerizó ni se alteró en su integridad y por lo tanto no se liberaron estos componentes a la fracción soluble.

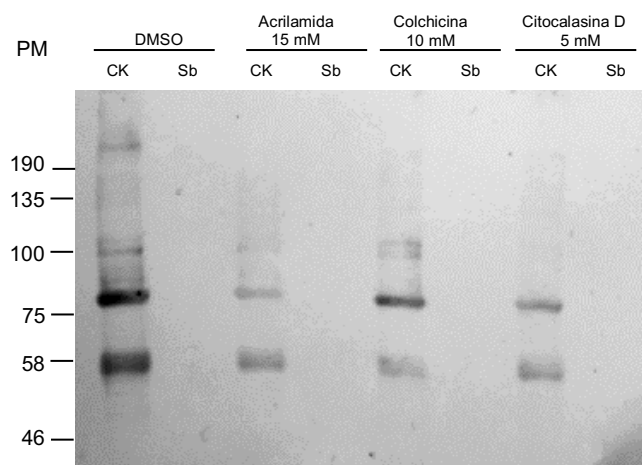


Figura 30. Detección de trichialina like sobre citoesqueletos subpeliculares incubados en presencia de acrilamida, colchicina y citocalasina D. Los citoesqueletos fueron expuestos durante 2 h en presencia de acrilamida 15 mM, citocalasina D 5 μ M y colchicina 10 mM, a temperatura ambiente durante 2 h. Se empleó DMSO 56 μ M, concentración máxima en el que se encuentra el stock de citocalasina D con respecto al stock de colchicina DMSO 4 μ M, ambos disueltos en medio PHEM. Se obtuvieron dos fases: una pastilla y un sobrenadante, los cuales se corrieron en el gel de poliacrilamida y se detectó trichialina like por Western blot.

9. Discusión

Toxoplasma es uno de los organismos más dinámicos que hay en la naturaleza y no utiliza organelos motores para esta actividad. Esta motilidad conocida como deslizamiento o gliding, se basa en la participación de actina filamentosa y motores moleculares de miosina (Håkansson et al., 1999). Adicionalmente, la forma típica de media luna del parásito está determinada por un citoesqueleto subpelicular de microtúbulos y una red filamentosa, que determinan el movimiento de deslizamiento con movimientos rotativos y que se dirigen desde el extremo posterior y hacia el extremo apical (Frixione, Mondragón, & Meza, 1996; Del Carmen et al., 2009). Otro evento dinámico es la extrusión del conoide, un proceso por el cual el conoide, un organelo retráctil con ubicación apical, es elongado a manera de estilete sobre la membrana de la célula blanco y durante la invasión y es retraído cuando el parásito se ubica al interior de la VP e inicia su proliferación (Mondragon & Frixione, 1996). La extrusión del conoide también depende de filamentos de actina y miosina con distribución apical (Frénal et al., 2017). El cuerpo del parásito es sometido a altas fuerzas tensoriales durante: a) las torsiones propias de la motilidad, b) la proyección del conoide, c) la penetración de la membrana celular a través de una horadación con diámetro menor al del parásito y que genera una constricción del cuerpo con la típica apariencia de cacahuate, d) la exteriorización de la célula invadida con una constricción del cuerpo del parásito similar a la que se presenta en la invasión pero con la diferencia que el parásito atraviesa la membrana de la VP y la membrana plasmática de la célula invadida y e) la diseminación tisular en la cual el parásito tiene que atravesar endotelios y epitelios, láminas basales así como el tejido conectivo constituido por la matriz extracelular que rodea a todos los tejidos. No obstante, todas estas presiones a las que está sujeto el parásito en el organismo invadido, el parásito rápidamente recupera su forma celular y mantiene su viabilidad y alta motilidad. Esta capacidad elástica estaría determinada por un citoesqueleto de filamentos intermedios, que a la fecha no se han descrito, es decir que no se han identificado filamentos intermedios en este patógeno ni en ningún otro *Apicomplexa*. Se ha sugerido que el películo y particularmente el complejo membranal interno, es la estructura que juega un papel primordial en esta función de protección contra las fuerzas tensoriales. Otro candidato es la red submembranal que está asociado al películo y que puede aislarse en fracciones insolubles a tratamientos con el detergente Tritón X-100 (Lemgruber et al., 2009). En el presente trabajo se

describe por primera vez una proteína relacionada a filamentos intermedios detectada mediante análisis proteómico en extractos de citoesqueletos y que correspondió a la tricohialina putativa B de 137 kDa y que designamos como tricohialina like. La tricohialina like fue inicialmente detectada en un análisis proteómico de citoesqueleto subpelicular del parásito *Toxoplasma gondii* (Gómez de León et al., 2014). El hallazgo de la tricohialina like nos dio la primera señal de la existencia de filamentos intermedios en *Toxoplasma*. La tricohialina es una proteína que está conservada en mamíferos y que posee dos principales propiedades, una es la autopolimerización para formar redes y otra es la capacidad de formar estas mismas redes muy estables y mecánicamente fuertes en asociación con queratina generando así resistencia contra las fuerzas tensoriales a los tejidos en donde se ha encontrado, como por ejemplo las células de la vaina de la raíz interna del folículo piloso (Lee et al., 1993b; Steinert, Kartasova, & Marekov, 1998; Steinert et al., 2003). La comparación de la secuencia de aminoácidos por análisis bioinformáticos de la tricohialina like mostró que su secuencia de aminoácidos se encuentra conservada entre las diferentes cepas de *T. gondii* y hay la presencia de genes ortólogos en otros Apicomplexas como *Neospora caninum* y *Hammondia hammondi* (Tabla 2). Aunque en otros parásitos no Apicomplexas como *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* también se han identificado tricohialinas putativas, aún no se han caracterizado a nivel molecular y mucho menos a nivel funcional. En nuestro análisis, se determinó la existencia de dos dominios de interés en la tricohialina like, los dominios PTZ00121 y MacS. El dominio PTZ00121 forma parte de una serie de proteínas denominadas Merozoite Adhesive Erythrocytic Binding Protein descritas en *Plasmodium malariae*, el parásito que produce malaria, y que están involucradas en la invasión con una localización apical (Kappe et al., 1998; Singh et al., 2004). El dominio transmembranal MacS se ha encontrado en otros organismos y contiene un dominio de mano EF canónico, un dominio de membrana interna de un canal de iones mecanosensible, que además es parte del sistema de salida de solutos impulsado por el fenómeno de turgencia que protege a las bacterias de la lisis en caso de choque osmótico (Sukharev, 2002). En el caso de *Toxoplasma* o en otros parásitos, no se le ha atribuido ninguna función biológica relacionada con el citoesqueleto. La secuencia de la tricohialina like contiene una serie de residuos repetidos similares a los repetidos en heptada que se han descrito en filamentos intermedios de mamíferos y en los cuales se le ha atribuido la función para autopolimerizarse y formar fila-

mentos. Dentro de la secuencia de la tricohialina like existen algunos aminoácidos conservados que tienen carga otorgada por la presencia de ácido glutámico, glutamina, lisina y arginina y que son muy parecidos a los encontrados en los neurofilamentos, un tipo de filamentos intermedios que contienen repetidos lisina-serina-prolina (KSP) (Cooper., 2000). La formación de filamentos de tricohialina like se podría sustentar mediante la predicción de la formación de dímeros o tetrámeros de acuerdo con el análisis de la estructura tridimensional de la tricohialina like obtenidas *in silico*. La formación de tetrámeros de tricohialina like aparentemente ocurre entre residuos de la parte carboxilo de la estructura primaria de cada subunidad, dicha estructura cuaternaria sería la más estable termodinámicamente en contraste con la formación de dímeros de tricohialina like.

La amplificación de los cDNAs de taquizoítos y la identificación de los transcritos de la tricohialina A y tricohialina like (o tricohialina B), se corroboró su expresión a nivel transcripcional en *Toxoplasma*.

En cuanto al análisis proteómico de la fracción de citoesqueleto se siguió la metodología para la obtención del extracto tal como lo realizó Gómez de León y col. 2014. Sin embargo, la técnica de identificación fue muy diferente, como en el procesamiento de la muestra para espectrometría, así como un distinto espectrómetro de masas y otra base de datos más actual. En este trabajo se empleó un equipo con mayor sensibilidad. En tanto su análisis se realizó con un software el cual considera 14 diferentes parámetros fisicoquímicos. Por ello las proteínas identificadas por Gómez de León no es comparable con la que nosotros realizamos. El análisis proteómico cuantitativo demostró la presencia de la tricohialina like, en una cantidad de 2.5 fmol a partir de 30 microgramos de extracto de citoesqueletos lo cual nos da una idea de lo limitada de su concentración en la muestra. Bardley et al (2005) reportó en un análisis proteómico de roptrias de la cepa ME49 de *Toxoplasma*, numerosas proteínas dentro de las cuales estaba una tricohialina putativa, aunque no se dieron mas detalles al respecto. Cabe destacar que en nuestras fracciones solubles obtenida durante el aislamiento del citoesqueleto, no se encontró la tricohialina like. La detección del transcrito de tricohialina A es indicativo que esta proteína efectivamente es expresada, no obstante, no fue detectada en el análisis proteómico, lo cual podría deberse a que esta molécula se encuentra en concentraciones por debajo del límite de resolución del espectrómetro de masas. Con base en lo anterior, el estudio de este trabajo solo se enfocó a la caracterización de la tricohialina like. Adicionalmente, en el análisis

proteómico cuantitativo detectó un total de 578 proteínas que se clasificaron de acuerdo con sus ubicaciones y funciones mostrándose su proporción en porcentaje en: Actina 2.07%, GRA 2.07%, proteínas de choque térmico 1.21%, Hipotéticas 26.64%, Membrana 6.05%, Metabolismo 9.34%, Micronemos 0.69%, Microtubulos 1.38%, Multifuncionales 2.42%, Núcleo 10.38%, Otras 0.69%, Proteasas 1.03%, Putativas 14.87%, Relacionados Filamentos intermedios 1.55%, Ribosomas 14.18%, Roptrías 4.32%, Unión a calcio 1.03%.

Se utilizó un suero policlonal generado en el laboratorio contra péptidos inmunogénicos de la tricohialina like. Este anticuerpo se empleó en los distintos experimentos y de forma pareada con el anticuerpo comercial contra tricohialina de mamífero. En el citoesqueleto subpelicular se lograron detectar consistentemente por Western blot 2 bandas con un peso de 57 y 90 kDa, pero no en el sobrenadante. También, de acuerdo con el análisis en geles de dos dimensiones se logró detectar un spot de 57 kDa y pI de 7.3. La base de datos de ToxoDB indica que la tricohialina tiene un peso teórico de 137 kDa, por lo que se podría sugerir que las proteínas aquí detectadas podrían estar sujetas a procesamientos postraduccionales, tales como ocurre con otras proteínas que sufren procesamiento proteolíticos que generen la proteína final (Rappsilber, 2002). Con base en los resultados obtenidos por Western blot la suma de las dos bandas detectadas si se suman corresponde al peso teórico de la tricohialina like por lo cual podría sufrir cortes proteolíticos.

El análisis proteómico del spot obtenido en geles bidimensionales mostró la presencia de proteínas detectadas por espectrometría de masas en las que una vez más, no se encontró a la tricohialina like, sugiriéndose de nuevo que la concentración relativa de esta molécula podría estar muy por debajo de las demás proteínas o que por su abundancia podrían haber enmascarado la detección de la tricohialina like. Una forma de optimizar esto sería realizar cromatografía de afinidad a fin de enriquecer la fracción con la tricohialina like. Adicionalmente, una secuenciación tipo Sanger podría ser requeridas para corroborar la presencia de esta molécula. La no correspondencia con el peso molecular o el pI indicado en la base de datos de ToxoDb, no descarta la posibilidad de que esta proteína pudiera estar incorrectamente anotada o que es procesada proteolíticamente o resultado de corte y empalme alternativo generando así proteínas de tamaños diferentes a los esperados (Yeoh et al., 2019). Las reactividades similares observadas con el anticuerpo comercial contra tricohialina y con el anticuerpo anti tricohialina B generada previamente en el laboratorio, evaluados por Western blot, microscopía

confocal e IEM indican que no es una señal inespecífica y que corresponde a una molécula que está asociada a una Red apical densa nunca descrita y con peculiaridades propias de filamentos intermedios. En cuanto a la detección de más de proteínas en un sólo spot esto sucede conforme a los avances tecnológicos en el desarrollo de los espectrómetros de masas, ya que se vuelven más sensibles y resolutivos. En un spot no siempre corresponde a una proteína, de hecho, es una mala practica en sólo reportar una proteína y es lo menos común. Adicionalmente en más de un spot se puede identificar a la misma proteína (Rappsilber, 2002; Lubec et al., 2003; Ríos-Castro et al., 2020).

El análisis por microscopía confocal mostró una distribución de la tricohialina like asociada al extremo apical y al conoide del parásito. Esta distribución no se modificó en parásito en procesos de extrusión del conoide, invasión y proliferación intracelular. La distribución permanente de la tricohialina en la zona apical del parásito sugiere que esta proteína podría ser una molécula de tipo estructural y que cumpliría funciones de andamio para mantener la región apical estabilizada no obstante estuviera la región apical sujeta a las fuerzas tensoriales mencionadas generadas en la motilidad, extrusión del conoide, invasión y exteriorización. En este sentido, se han reportado proteínas que permanecen en el extremo apical durante la extrusión del conoide y en la invasión en *Toxoplasma* y otros Apicomplexas para mantener su estabilidad (Hu et al., 2006; Wall et al., 2016; Long et al., 2017a, Long et al., 2017b). Graindorge (2016) menciona que “más de 170 proteínas se han identificado en el conoide enriquecidas en esta fracción con proteínas como dineína, proteínas de unión a calcio, proteínas que contienen dominios MORN, centrina, y algunas miosinas de cadena pesada y ligera” (Graindorge et al., 2016; Hu et al., 2006).

La localización precisa ultraestructural de la tricohialina like se determinó mediante ensayos de IEM en cortes finos de parásitos completos embebidos en resina LR-white. Se observó mediante la marca de oro coloidal que esta molécula está asociada de manera específica a la zona mas apical de la cara citosólica del complejo membranal interno, así como al conoide. La presencia de la tricohialina like en el conoide y en la zona apical, así como su asociación con moléculas del complejo membranal interno evidenciado por el análisis proteómico sustenta la propuesta que pudiera ser una molécula con función estructural y de andamiaje a fin de proteger al parásito contra el estrés mecánico y tensorial generado durante la extrusión, invasión y

exteriorización del parásito. Tal como las proteínas IMCs con dominio alveolina del citoesqueleto se han reportado que forman parte esencial del complejo membranal interno y participan en otorgar estabilidad al películo (Fung et al., 2012; Tonkin et al., 2014).

Cuando se realizó el análisis de la distribución de la tricohialina por MET en citoesqueletos aislados de *T. gondii*, se encontró específicamente el marcaje de oro coloidal en dos sitios: en la RdApDs y en el conoide. La RdApDs que no ha sido descrita por otros autores, había sido detectada previamente en preparaciones de citoesqueletos de *Toxoplasma* en el laboratorio, pero no reportadas. Un hallazgo muy interesante fue el encontrar una abundante marca correspondiente a tricohialina precisamente en esa Red apical densa. La RdApDs, es una estructura que aparentemente inicia o se organiza en el anillo polar apical y que parece integrarse para formar posteriormente la red subpelicular que se distribuye hacia la parte media y el extremo posterior del parásito. Muestra cierta asociación con los microtúbulos subpeliculares, y tiene una longitud hacia el eje longitudinal del parásito de entre 600-1000 nm. Morfológicamente, esta estructura está constituida por una malla mas compacta y electrodensa en comparación con la red supelicular que se distribuye por todo el cuerpo del parásito. Interesantemente, cuando se buscaron indicios de la RdApDs en cortes finos de taquizoítos íntegros embebidos en resina Spurr y con lo cual se logra obtener la máxima resolución de una micrografía al MET, se encontró que efectivamente a nivel apical y por debajo del conoide hay una línea subpelicular electrodensa que se diferencia fácilmente del resto del películo y que coincide exactamente con la ubicación y con las características morfométricas de la RdApDs. Esta línea subpelicular electrodensa se encontró en parásitos extracelulares, en invasión y en parásitos intracelulares en proliferación sustentando la posible función como un elemento estructural de esa región del parásito. Adicionalmente se corroboró la presencia de una serie de fibras de aproximadamente 5 nm de ancho y 50 nm de longitud y que interconectan al conoide con el anillo polar anterior como posible elementos de conexión entre ambas estructuras de citoesqueleto. Estas fibras ya habían sido detectadas previamente en nuestro laboratorio, sin embargo, aún no han sido reportadas. El conoide como un organelo contráctil, tiene la capacidad de proyectarse empujando hacia adelante del extremo apical a la membrana plasmática y en caso de reposo, de interiorizarse incluso a nivel medio del anillo polar. El hecho de que el conoide se proyecte o internalice solo en una extensión longitudinal, habla de la presencia de moléculas estructurales que limitan este grado de extensión o retracción y las fibras de anclaje

podrían muy bien ser los componentes que podrían cumplir la función de, a) posicionamiento del conoide y b) limitación del grado de extensión o retracción de este organelo durante la invasión o exteriorización del parásito. Como se demostró previamente, la fuerza motriz para la extrusión del conoide depende de actina y miosina (Mondragón et al, 1996). Las únicas fibras que se han descrito son las que forman parte del conoide, una espiral como un resorte comprimido formado por α -tubulina (Hu, Roos & Murray, 2002). En reportes donde se caracterizó la composición del conoide no se reportó la presencia de la tricohialina y esto podría estar relacionado en que durante el aislamiento de los conoide pudiera haberse liberado la red de citoesqueleto y con ello la RdApDs (Hu et al., 2006; Anderson-White et al., 2012).

La presencia de tricohialina en el citoesqueleto subpelicular nos permite sugerir que los filamentos intermedios de este parásito podrían estar formados por esta proteína al menos aquellos que estarían ubicados en la zona apical. En un reporte previo de nuestro grupo (Patrón et al., 2005), se aisló con éxito actina a partir de fracciones de citoesqueleto de *Toxoplasma* y se logró inducir su polimerización *in vitro* y formación de filamentos característicos e incluso lograr la decoración de estos filamentos *in vitro* con moléculas de mero-miosina pesada validando así la purificación de actina globular y su polimerización (Patrón et al., 2005). Siguiendo una estrategia similar, a partir de geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras, se cortaron las dos bandas de 58 y 90 kDa de tricohialina previamente descritas, se eluyeron y se sometieron a condiciones de polimerización para filamentos intermedios y se observaron al TEM (Modificado de Inagaki et al. 1988). Como control se eluyó una banda de albúmina sérica bovina y se procesó al igual que se hizo para las bandas de tricohialina. Los resultados mostraron la formación de filamentos e incluso de redes con características similares a la RdApDs. Cuando se incubaron estos filamentos con el anticuerpo anti tricohialina, se obtuvo un marcaje específico indicando que estas estructuras contenían a esta molécula confirmando así lo predicho mediante el análisis bioinformático en el cual los monómeros eran capaces de asociarse entre si para formar tetrámeros y de ahí estructuras filamentosas.

En la búsqueda de moléculas que pudieran estar asociadas a la tricohialina, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y estos fueron identificados por espectrometría de masas. No se logró identificar la tricohialina, la ausencia de esta molécula en el análisis proteómico, se puede deber a tres explicaciones: a) por estar presente en muy baja cantidad, y por lo tanto

ser enmascarada por otras proteínas presentes en mayor concentración en la muestra, b) también existe la posibilidad de que esta proteína pudiera estar incorrectamente anotada o c) que es una proteína que es procesada proteolíticamente una vez que es sintetizada generando así proteínas de tamaños diferentes a los esperados. Los resultados mostraron diversas proteínas que para fines de interpretación se categorizaron en proteínas asociadas a filamentos intermedios, proteínas relacionadas con actina, proteínas asociadas a microtúbulos, proteínas hipotéticas, proteínas putativas, relacionadas con el núcleo, proteínas asociadas a choque térmico, asociadas a ribosomas, asociadas al metabolismo, de roptrias, de gránulos densos, proteasas, proteínas multifuncionales y otras proteínas. Algunas de estas proteínas no se han reportado a la fecha. En el análisis de estas moléculas se buscaron los dominios alveolina que son característicos de las proteínas del IMC ya que se ha propuesto que estas pudieran ser los posibles candidatos de filamentos intermedios en *Toxoplasma*. Las alveolinas son comunes y únicas a esta estructura del películo en organismos del grupo alveolata y tienen un dominio alveolina, los cuales contienen repetidos ricos residuos de valina y prolina (EKIEVP, EVVR, VPV) (Gould et al., 2008; Gould et al., 2011). Se han descrito alveolinas que interactúan con varios grupos de proteínas del glideosoma (Bullen et al., 2009; Gould et al., 2011). Nuestros datos mostraron que la tricohialina like de *Toxoplasma*, interactúa con los posibles filamentos intermedios (proteínas del IMC), así como con las proteínas relacionadas con actina y microtúbulos. El análisis también mostró una interacción de la tricohialina like con proteínas de membrana, y esto podría explicar el anclaje que se detecta de esta RdApDs rica en tricohialina con la cara citosólica del IMC visto por TEM. A nivel apical se encuentran los organelos secretores de *Toxoplasma* como son, los gránulos densos, los micronemos y las roptrias. Los gránulos densos también están en otras zonas del parásito. Proteínas como las MIC de micronemos, son esenciales para la adhesión del parásito al substrato y para su motilidad por deslizamiento sobre la membrana de las células blanco, mientras que otras como las proteínas RON de roptrias, son necesarias para la invasión. Varias de ellas se detectaron en los inmunoprecipitados así como algunas proteasas (Lebrun et al., 2007; Lebrun et al., 2013). El hecho de encontrarse otras proteínas no necesariamente relacionadas al citoesqueleto como fueron proteínas de núcleo o las relacionadas con el metabolismo no descarta la posibilidad de que también de alguna forma pudieran estar relacionadas a la tricohialina sobre todo porque el citoesqueleto nuclear de células eucariotas, está precisamente constituido por las laminas nucleares, un tipo

particular de filamentos intermedios (Houben et al., 2007). Se requerirán mas estudios para determinar el tipo de interacción de la tricohialina con todas las proteínas detectadas incluyendo proteínas solubles como las de choque térmico HSP70 y HSP90 que también fueron identificadas en los inmunoprecipitados. La HSP70 participa en la proliferación celular, mientras que HSP90 está relacionada con la invasión, replicación y en la diferenciación taquizoíto-bradizoíto (Sun et al., 2017). No necesariamente todas las proteínas identificadas en los inmunoprecipitados son moléculas que tienen una interacción directa con las moléculas de tricohialina, no se puede descartar la posibilidad de la existencia de complejos multiméricos en forma de red y que por lo tanto contengan proteínas asociadas a la tricohialina de manera indirecta. La aplicación de la técnica de Crisp/cas9 para inducir la delección de la tricohialina podría proporcionar datos muy interesantes sobre las funciones celulares e interacciones moleculares en *Toxoplasma*.

La evaluación de compuestos o inhibidores que alteran la integridad y funcionalidad del citoesqueleto en una célula determinada ha sido ampliamente usado para evidenciar la participación de diversas moléculas a través de la interacción con filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Por ejemplo, se ha utilizado la colchicina para producir la interrupción en los microtúbulos en *T. gondii* para determinar su contribución en la invasión de macrófagos, los cuales son células efectoras que cuando se activan, pueden destruir al parásito, pero cuando están siendo invadidas por *Toxoplasma* pueden fungir un papel de caballo de troya para la diseminación del parásito por todo el organismo alcanzando incluso órganos privilegiados como el cerebro y ojo y en mujeres embarazadas la placenta y el feto (Morrissette & Sibley, 2002). No obstante, no se observó un efecto directo de este xenobiótico en el citoesqueleto subpelicular sobre el daño directo contra la tricohialina like. Similarmente, la citocalasina D un poderoso agente despolimerizador de filamentos de actina, ha sido reportado inhibir la invasión por *Toxoplasma*, así como el proceso de extrusión del conoide (Ryning & Remington, 1978; Patrón et al 2005). La acrilamida ha sido similarmente utilizada para alterar la integridad de los filamentos intermedios (Sager, 1989; Cerecedo et al., 2013). Cuando la colchicina, la citocalasina D y la acrilamida se utilizaron sobre una fracción insoluble de citoesqueleto de *Toxoplasma* para determinar algún posible efecto sobre la integridad de la RdApDs, con la liberación al sobrenadante de la tricohialina de *T. gondii*, no se detectó efecto alguno sugiriéndose que la integridad de esta estructura o andamio molecular no depende de los microtúbulos o de los

filamentos de actina. Adicionalmente, la exposición a acrilamida no produjo efecto en la integridad de la trichialina like asociada al citoesqueleto subpelicular. Tal vez, para realizar su despolimerización, se requieran de condiciones más extremas u otros fármacos más específicos, por lo que la trichialina like podría ser un excelente blanco para el diseño de fármacos y futuros estudios en su papel durante la invasión. Con base en los hallazgos de este trabajo, nos permitimos proponer un modelo estructural de la RdApDs de *Toxoplasma*. En la Figura 31 se indican los sitios en donde se encontró a la trichialina like, así como la RdApDs que se encuentran en el citoesqueleto subpelicular de *T. gondii* y las fibras de anclaje, ya previamente observadas, pero aún no reportados por nuestro grupo.

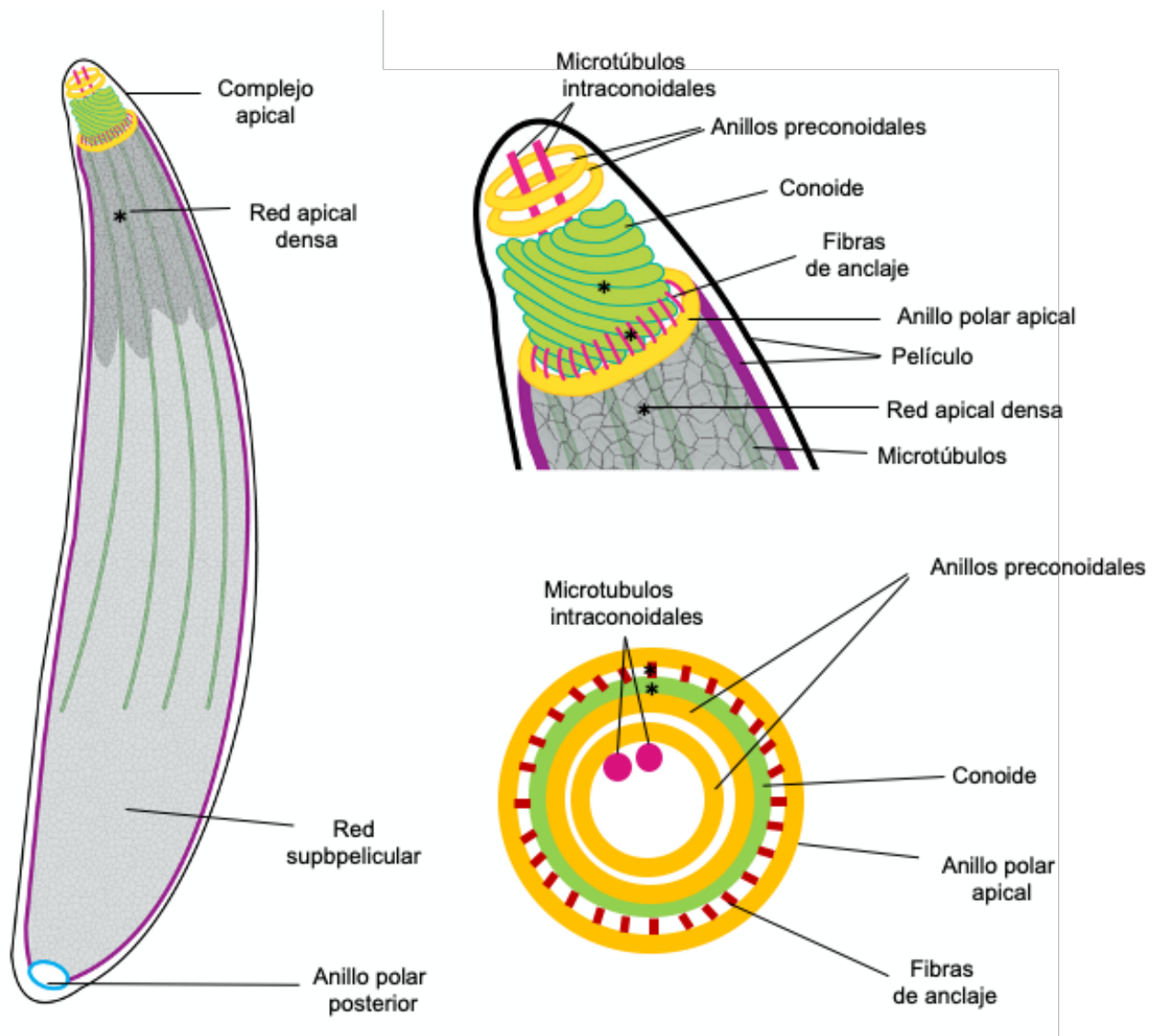


Figura 31. Esquema del citoesqueleto subpelicular de *T. gondii*. Se muestra cada una de las estructuras que componen el citoesqueleto de *T. gondii*, como son: anillos preconoidales,

conoide, fibras de anclaje, anillo polar apical, películo, red apical densa, microtúbulos, red subpelicular y anillo polar posterior. A la izquierda se ilustra el parásito completo. En la parte superior derecha se muestra una ampliación del complejo apical. En la parte inferior derecha, aparece una vista transversal del complejo apical. Los asteriscos representan los sitios en donde se identificó la tricohialina like en el citoesqueleto subpelicular.

10. Conclusiones

1. En el extracto de citoesqueletos de taquizoítos de *T. gondii* se logró identificar y cuantificar un total de 578 proteínas, entre ellas la tricohialina like.
2. La tricohialina like es una proteína conservada en el *phylum Apicomplexa*.
3. Se detectó una proteína relacionada con filamentos intermedios denominada tricohialina-like en extractos totales y de citoesqueletos subpeliculares de taquizoítos de *T. gondii*.
4. La localización de la tricohialina like es en el extremo apical cercano al conoide, cuya distribución no se modifica durante la invasión, proliferación y egreso.
5. La tricohialina like se halla ultraestructuralmente asociada al conoide, y a una red apical densa.
6. Las bandas reconocidas por el anticuerpo anti-tricohialina generaron *in vitro* estructuras en forma de red y fueron inmunodetectadas por el Ac anti tricohialina. Estas redes son muy similares a las encontradas en la red apical densa.
7. Los agentes que alteran el citoesqueleto de actina F y microtúbulos, así como el disruptor de filamentos intermedios-acrilamida no afectaron la distribución de la tricohialina like en la red apical densa de citoesqueletos subpeliculares.
8. Por primera vez se identificó una proteína relacionada con filamentos intermedios, la cual podría ser esencial para mantener la estabilidad durante la extrusión del conoide y la invasión.

11. Perspectivas

1. Realizar un análisis más detallado sobre las proteínas detectadas por espectrometría de masas del extracto de citoesqueleto.
2. Diseñar un RNAi que permita determinar su efecto durante la invasión, proliferación y egreso del parásito.
3. Generar una cepa *knock out* de la tricohialina like y realizar pruebas de inducción del conoide, invasión y proliferación, así como determinar los cambios en la estructura del citoesqueleto subpelicular.
4. Cristalizar la proteína de tricohialina like para determinar su estructura tridimensional.
5. Realizar un análisis bioinformático de las proteínas hipotéticas encontradas en el extracto de citoesqueletos e inmunoprecipitado.

12. Bibliografía

- Ajioka, J. W., Boothroyd, J. C., Brunk, B. P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I. D., Sibley, L. D. (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the apicomplexa. *Genome Research*, 8(1), 18–28. <https://doi.org/10.1101/gr.8.1.18>
- Anderson-White, B., Beck, J. R., Chen, C.-T., Meissner, M., Bradley, P. J., & Gubbels, M.-J. (2012). Cytoskeleton assembly in *Toxoplasma gondii* cell division. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 1–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00001-8>
- Anderson-White, B. R., Ivey, F. D., Cheng, K., Szatanek, T., Lorestani, A., Beckers, C. J., Gubbels, M.-J. (2011). A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 13(1), 18–31. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01514.x>
- Appleford, P. J., & Smith, J. E. (1997). *Toxoplasma gondii*: The growth characteristics of three virulent strains. *Acta Tropica*, 65(2), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00656-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00656-6)
- Aurrecochea, C., Heiges, M., Wang, H., Wang, Z., Fischer, S., Rhodes, P., Kissinger, J. C. (2007). ApiDB: Integrated resources for the apicomplexan bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), 427–430. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl880>
- Barragan, A., & Sibley, L. D. (2002). Transepithelial Migration of *Toxoplasma gondii* Is Linked to Parasite Motility and Virulence. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(12), 1625–1633. <https://doi.org/10.1084/jem.20020258>
- Barragan, A., & Sibley, L. D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology*, 11(9), 426–430. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00205-1)
- Bohne, W., Heesemann, J., & Gross, U. (1994). Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: A possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infection and Immunity*, 62(5), 1761–1767.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bradley, P. J., Ward, C., Cheng, S. J., Alexander, D. L., Collier, S., Coombs, G. H., Boothroyd,

- J. C. (2005). Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34245–34258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504158200>
- Bullen, H. E., Tonkin, C. J., O'Donnell, R. A., Tham, W.-H., Papenfuss, A. T., Gould, S., Gilson, P. R. (2009). A novel family of Apicomplexan glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25353–25363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036772>
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology*, 73(2), 114–123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9208224>
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cellular Microbiology*, 1(3), 225–235. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207555>
- Cerecedo, D., Martínez-Vieyra, I., Mondragón, R., Mondragón, M., González, S., & Galván, I. J. (2013). Haemostatic role of intermediate filaments in adhered platelets: Importance of the membranous system stability. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(9), 2050–2060. <https://doi.org/10.1002/jcb.24546>
- Cooper., G. M. (2000). *The Cell* (2nd edition) Chapter 11. The Cytoskeleton and Cell Movement. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cornelissen, A. W., & Overdulve, J. P. (1985). Sex determination and sex differentiation in coccidia: gametogony and oocyst production after monoclonal infection of cats with free-living and intermediate host stages of *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*. *Parasitology*, 90 (Pt 1), 35–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3982853>
- Dalmasso, M. C., Carmona, S. J., Angel, S. O., & Agüero, F. (2014). Characterization of *Toxoplasma gondii* subtelomeric-like regions: identification of a long-range compositional bias that is also associated with gene-poor regions. *BMC Genomics*, 15(3), 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-21>
- Del Carmen, M. G., Mondragón, M., González, S., & Mondragón, R. (2009). Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 11(6), 967–982. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01304.x>

- Díaz, R. & Mondragón, R. (2017). Ciclo de vida en Galvan, M., & Mondragón, R. (Ed) Toxoplasmosis humana (1ª ed., pp. 68-89) ECFORFAN® México.
- Dobrowolski, J. M., Niesman, I. R., & Sibley, L. D. (1997). Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 37(3), 253–262. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)37:3<253::AID-CM7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:3<253::AID-CM7>3.0.CO;2-7)
- Dobrowolski, J. M., & Sibley, L. D. (1996). *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*, 84(6), 933–939. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601316>
- Dubey, J P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1019–1024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724872>
- Dubey, J P, & Frenkel, J. K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *The Journal of Protozoology*, 23(4), 537–546. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1003342>
- Dubey, J P, Speer, C. A., Shen, S. K., Kwok, O. C., & Blixt, J. A. (1997). Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *The Journal of Parasitology*, 83(5), 870–882. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379292>
- Dubey, J P, Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Micro*
- Dubey, J P, Morales, J. A., Sundar, N., Velmurugan, G. V, González-Barrientos, C. R., Hernández-Mora, G., & Su, C. (2007). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *The Journal of Parasitology*, 93(3), 710–711. <https://doi.org/10.1645/GE-1120R.1>
- Dubey, Jitender P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(6), 467–475. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>
- Dubey, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>
- Dubremetz, J. F. (1998). Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Microbiology*, 6(1), 27–30. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01165-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01165-7)

- Ferguson D, David J P. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 133–148. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200003>
- Ferguson, D. J., & Hutchison, W. M. (1987). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitology Research*, 73(6), 483–491. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3422976>
- Filisetti, D., & Candolfi, E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 40(1), 71–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269455>
- Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., & Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>
- Foussard, F., Gallois, Y., Tronchin, G., Robert, R., & Mauras, G. (1990). Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. *Parasitology Research*, 76(7), 563–565. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2217115>
- Francia, M. E., & Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(2), 125–136. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3184>
- Frénal, K., Jacot, D., Hammoudi, P.-M., Graindorge, A., Maco, B., & Soldati-Favre, D. (2017). Myosin-dependent cell-cell communication controls synchronicity of division in acute and chronic stages of *Toxoplasma gondii*. *Nature Communications*, 8, 15710. <https://doi.org/10.1038/ncomms15710>
- Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around Us. *BioScience*, 23(6), 343–352. <https://doi.org/10.2307/1296513>
- Frixione, E., Mondragón, R., & Meza, I. (1996). Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 34(2), 152–163. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1996\)34:2<152::AID-CM6>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1996)34:2<152::AID-CM6>3.0.CO;2-D)
- Fung, C., Beck, J. R., Robertson, S. D., Gubbels, M.-J., & Bradley, P. J. (2012). *Toxoplasma* ISP4 is a central IMC sub-compartment protein whose localization depends on palmitoylation but not myristoylation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 184(2), 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.05.002>
- Fux, B., Nawas, J., Khan, A., Gill, D. B., Su, C., & Sibley, L. D. (2007). *Toxoplasma gondii*

- strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation. *Infection and Immunity*, 75(5), 2580–2590. <https://doi.org/10.1128/IAI.00085-07>
- Gajria, B., Bahl, A., Brestelli, J., Dommer, J., Fischer, S., Gao, X., ... Brunk, B. P. (2008). ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D553-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm981>
- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., & Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Cell Biology*, 165(3), 383–393. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311137>
- Gómez de León, C. T., Díaz Martín, R. D., Mendoza Hernández, G., González Pozos, S., Ambrosio, J. R., & Mondragón Flores, R. (2014). Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal of Proteomics*, 111, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.008>
- Gould, S. B., Tham, W. H., Cowman, A. F., McFadden, G. I., & Waller, R. F. (2008). Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. *Molecular Biology and Evolution*, 25(6), 1219–1230. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn070>
- Gould, S. B., Kraft, L. G. K., Van Dooren, G. G., Goodman, C. D., Ford, K. L., Cassin, A. M., Waller, R. F. (2011). Ciliate pellicular proteome identifies novel protein families with characteristic repeat motifs that are common to alveolates. *Molecular Biology and Evolution*, 28(3), 1319–1331. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq321>
- Graindorge, A., Fréchal, K., Jacot, D., Salamun, J., Marq, J. B., & Soldati-Favre, D. (2016). *Toxoplasma gondii* Entry and Exit from Host Cells. *PLoS Pathogens*, 12(1), e1005388. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005388>
- Greenberg, S., Chang, P., & Silverstein, S. C. (1993). Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(2), 529–534. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678851>
- Gubbels, M. J., White, M., & Szatanek, T. (2008). The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division: Tightly knit or loosely stitched? *International Journal for Parasitology*, 38(12), 1343–1358. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.004>
- Håkansson, S., Morisaki, H., Heuser, J., & Sibley, L. D. (1999). Time-Lapse Video Microscopy of Gliding Motility in *Toxoplasma gondii* Reveals a Novel, Biphasic Mechanism of Cell Locomotion. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3539–3547.

<https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3539>

- Halonen, S., & Weiss, L. (2014). Toxoplasmosis. *Handb clin Neurol*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.T>
- Heintzelman, M. B., & Schwartzman, J. D. (1997). A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Molecular Biology*, 271(1), 139–146.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1167>
- Heintzelman, M. B., & Schwartzman, J. D. (1999). Characterization of myosin-A and myosin-C: two class XIV unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 44(1), 58–67. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(199909\)44:1<58::AID-CM5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(199909)44:1<58::AID-CM5>3.0.CO;2-R)
- Heintzelman, M. B., & Schwartzman, J. D. (2001). Myosin diversity in Apicomplexa. *The Journal of Parasitology*, 87(2), 429–432. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0429:MDIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0429:MDIA]2.0.CO;2)
- Hettmann, C., Herm, A., Geiter, A., Frank, B., Schwarz, E., Soldati, T., & Soldati, D. (2000). A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4), 1385–1400.
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1385>
- Houben, F., Ramaekers, F. C. S., Snoeckx, L. H. E. H., & Broers, J. L. V. (2007). Role of nuclear lamina-cytoskeleton interactions in the maintenance of cellular strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(5), 675–686.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.018>
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561–1566. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7594717>
- Hsu, P. C., Groer, M., & Beckie, T. (2014). New findings: Depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 26(11), 629–637. <https://doi.org/10.1002/2327-6924.12129>
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Murray, J. M. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 2(2), e13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>
- Hu, K., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of

- Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1039–1050.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200112086>
- Hutchison, W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206(987), 961–962. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5839865>
- Inagaki, M., Gonda, Y., Matsuyama, M., Nishizawa, K., Nishi, Y., & Sato, C. (1988). Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(12), 5970–5978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2833525>
- Jones, J., Lopez, A., & Wilson, M. (2003). Congenital toxoplasmosis. *American Family Physician*, 67(10), 2131–2138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12776962>
- Jones, T. C., & Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *The Journal of Experimental Medicine*, 136(5), 1173–1194. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4343243>
- Kappe, S. H., Noe, A. R., Fraser, T. S., Blair, P. L., & Adams, J. H. (1998). A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1230–1235. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1230>
- Kasper, L. H., & Mineo, J. R. (1994). Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 10(5), 184–188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275469>
- Katris, N. J., van Dooren, G. G., McMillan, P. J., Hanssen, E., Tilley, L., & Waller, R. F. (2014). The Apical Complex Provides a Regulated Gateway for Secretion of Invasion Factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathogens*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004074>
- Kaufman, H. E., & Maloney, E. D. (1962). Multiplication of three strains of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *The Journal of Parasitology*, 48, 358–361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14454443>
- Keeley, A., & Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in Cell Biology*, 14(10), 528–532. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.08.002>

- Kessler, H., Herm-Götz, A., Hegge, S., Rauch, M., Soldati-Favre, D., Frischknecht, F., & Meissner, M. (2008). Microneme protein 8--a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 7), 947–956. <https://doi.org/10.1242/jcs.022350>
- Khan, A., & Grigg, M. E. (2017). *Toxoplasma gondii*: Laboratory Maintenance and Growth. *Current Protocols in Microbiology*, *44*, 20C.1.1-20C.1.17. <https://doi.org/10.1002/cpmc.26>
- King, C. A. (1988). Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, *4*(11), 315–319. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463014>
- Lebrun, M., Carruthers, V. B., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2007). *Toxoplasma* Secretory Proteins and their Roles in Cell Invasion and Intracellular Survival. In *Toxoplasma Gondii* (pp. 265–316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012369542-0/50013-1>
- Lebrun, Maryse, Carruthers, V. B., & Cesbron-Delauw, M. F. (2013). *Toxoplasma Secretory Proteins and Their Roles in Cell Invasion and Intracellular Survival. Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00012-X>
- Lee, S. C., Wang, M., McBride, O. W., O'Keefe, E. J., Kim, I. G., & Steinert, P. M. (1993a). Human trichohyalin gene is clustered with the genes for other epidermal structural proteins and calcium-binding proteins at chromosomal locus 1q21. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12354504>
- Lee, S., Kim, I., Marekov, L. N., Keefes, E. J. O., Parry, D. A. D., & Steinert, P. M. (1993b). The Structure of Human Trichohyalin. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(16), 12164–12176.
- Lemgruber, L., Kloetzel, J. A., de Souza, W., & Vommaro, R. C. (2009). *Toxoplasma gondii*: Further studies on the subpellicular network. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(5), 706–709. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000500007>
- Li, L., Crabtree, J., Fischer, S., Pinney, D., Stoeckert, C. J., Sibley, L. D., & Roos, D. S. (2004). ApiEST-DB: analyzing clustered EST data of the apicomplexan parasites. *Nucleic Acids Research*, *32*(Database issue), D326-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh112>
- Li, G.-Z., Vissers, J. P. C., Silva, J. C., Golick, D., Gorenstein, M. V, & Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*, *9*(6), 1696–1719. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800564>

- Long, S., Anthony, B., Drewry, L. L., & Sibley, L. D. (2017a). A conserved ankyrin repeat-containing protein regulates conoid stability, motility and cell invasion in *Toxoplasma gondii*. *Nature Communications*, 8(1), 2236. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02341-2>
- Long, S., Brown, K. M., Drewry, L. L., Anthony, B., Phan, I. Q. H., & Sibley, L. D. (2017b). Calmodulin-like proteins localized to the conoid regulate motility and cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006379>
- Lubec, G., Krapfenbauer, K., & Fountoulakis, M. (2003). Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in neurobiology*, 69(3), 193–211. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00036-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00036-4)
- Makioka, A., Suzuki, Y., & Kobayashi, A. (1991). Recognition of tachyzoite and bradyzoite antigens of *Toxoplasma gondii* by infected hosts. *Infection and Immunity*, 59(8), 2763–2766. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1713199>
- Manabe, M., & O'Guin, W. M. (1992). Keratohyalin, Trichohyalin and Keratohyalin-Trichohyalin Hybrid Granules: An Overview. *The Journal of Dermatology*, 19(11), 749–755. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1992.tb03774.x>
- Mann, T., & Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous.pdf, 115, 257–268.
- Mazzillo, F. F. M., Shapiro, K., & Silver, M. W. (2013). A new pathogen transmission mechanism in the ocean: the case of sea otter exposure to the land-parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*, 8(12), e82477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082477>
- Mondragon, R, Howe, D. K., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (1998). Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *The Journal of Parasitology*, 84(3), 639–641. from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645877>
- Mondragon, Ricardo, & Frixione, E. (1996). Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04491.x>
- Morisaki, J. H., Heuser, J. E., & Sibley, L. D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 6, 2457–2464. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673360>
- Morrisette, N S, Murray, J. M., & Roos, D. S. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal*

- of Cell Science*, 110 (Pt 1, 35–42).
- Morrisette, Naomi S, & Sibley, L. D. (2002). Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 5), 1017–1025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870220>
- Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Protozoology*, 34(2), 217–226. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3585817>
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L., & O'Connor, G. R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *Journal of Ultrastructure Research*, 83(1), 85–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6854716>
- Nichols, B. A., & O'Connor, G. R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 44(4), 324–335. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7206629>
- Nishizawa, M., Izawa, I., Inoko, A., Hayashi, Y., Nagata, K., Yokoyama, T., Inagaki, M. (2005). Identification of trichoplein, a novel keratin filament-binding protein. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 5), 1081–1090. <https://doi.org/10.1242/jcs.01667>
- O'Guin, W. M., Sun, T. T., & Manabe, M. (1992). Interaction of trichohyalin with intermediate filaments: Three immunologically defined stages of trichohyalin maturation. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12494172>
- Patrón S, A., Mondragón, M., González, S., Ambrosio, J. R., Guerrero B, A. L., & Mondragón, R. (2005). Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, 35(8), 883–894. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.016>
- Radke, J. R., & White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 94(2), 237–247. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747974>
- Rappsilber, J., & Mann, M. (2002). What does it mean to identify a protein in proteomics?. *Trends in biochemical sciences*, 27(2), 74–78. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)02021-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)02021-7)
- Ríos-Castro, E., Souza, G., Delgadillo-Álvarez, D. M., Ramírez-Reyes, L., Torres-Huerta, A. L., Velasco-Suárez, A., Cruz-Cruz, C., Hernández-Hernández, J. M., & Tapia-Ramírez, J.

- (2020). Quantitative Proteomic Analysis of MARC-145 Cells Infected with a Mexican Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain Using a Label-Free Based DIA approach. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00134>
- Ryning, F. W., & Remington, J. S. (1978). Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. *Infection and Immunity*, *20*(3), 739–743. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/669821>
- Sabin, A. B. (1941). TOXOPLASMIC ENCEPHALITIS IN CHILDREN. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *116*(9), 801. <https://doi.org/10.1001/jama.1941.02820090001001>
- Sager, P. R. (1989). Cytoskeletal effects of acrylamide and 2,5-hexanedione: Selective aggregation of vimentin filaments. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *97*(1), 141–155. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(89\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(89)90063-X)
- Sandoval, F. & Mondragón, R. (2017). Ciclo de vida en Galvan, M., & Mondragón, R. (Ed) *Toxoplasmosis humana* (1^a ed., pp. 24-36) ECORFAN® México.
- Schwartzman, J. D., & Saffer, L. D. (1992). How *Toxoplasma gondii* gets in and out of host cells. *Sub-Cellular Biochemistry*, *18*, 333–364. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1485356>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V, & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, *1*(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Sibley, L D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5668), 248–253. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>
- Sibley, L D, & Boothroyd, J. C. (1992). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *51*(2), 291–300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574087>
- Sibley, L David. (2009). Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, *39*(8), 915–924. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.011>
- Singh, N., Preiser, P., Rénia, L., Balu, B., Barnwell, J., Blair, P., Adams, J. H. (2004). Conservation and developmental control of alternative splicing in *maeb1* among malaria parasites. *Journal of Molecular Biology*, *343*(3), 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.047>

- Song, G., & Springer, T. A. (2014). Structures of the *Toxoplasma* gliding motility adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(13), 4862–4867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403059111>
- Steinert, P. M., Kartasova, T., & Marekov, L. N. (1998). Biochemical evidence that small proline-rich proteins and trichohyalin function in epithelia by modulation of the biomechanical properties of their cornified cell envelopes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11758–11769. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11758>
- Steinert, P. M., Parry, D. A. D., & Marekov, L. N. (2003). Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: Multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41409–41419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302037200>
- Su, C. (2003). Recent Expansion of *Toxoplasma* Through Enhanced Oral Transmission. *Science*, 299(5605), 414–416. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>
- Sukharev, S. (2002). Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. *Biophysical Journal*, 83(1), 290–298. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75169-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75169-2)
- Sun, H., Zhuo, X., Zhao, X., Yang, Y., Chen, X., Yao, C., & Du, A. (2017). The heat shock protein 90 of *Toxoplasma gondii* is essential for invasion of host cells and tachyzoite growth. *Parasite (Paris, France)*, 24, 22. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017023>
- Tonkin, M. L., Beck, J. R., Bradley, P. J., & Boulanger, M. J. (2014). The inner membrane complex sub-compartment proteins critical for replication of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* adopt a pleckstrin homology fold. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(20), 13962–13973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548891>
- Vallochi, A. L., Goldberg, A. C., Falcai, A., Ramasawmy, R., Kalil, J., Silveira, C., Rizzo, L. V. (2008). Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 2(4), 837–848. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668438>
- Vyas, A., Kim, S.-K., Giacomini, N., Boothroyd, J. C., & Sapolsky, R. M. (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6442–6447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608310104>
- Wall, R. J., Roques, M., Katris, N. J., Koreny, L., Stanway, R. R., Brady, D., Tewari, R. (2016).

SAS6-like protein in Plasmodium indicates that conoid-associated apical complex proteins persist in invasive stages within the mosquito vector. *Scientific Reports*, 6, 28604. <https://doi.org/10.1038/srep28604>

Yeoh, L. M., Lee, V. V., McFadden, G. I., & Ralph, S. A. (2019). Alternative splicing in apicomplexan parasites. *MBio*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/mBio.02866-18>

13. U.R.L. (*Uniform Resource Locator*)

1. Bulletin of the World Health Organization: <http://www.who.int/bulletin/volumes/93/4/14-139972/en/>

2. Center for Disease Control and Prevention (CDC): <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/>

14. Anexos

Tabla 7. *Aminoácidos evaluados para el gráfico de Ramachandran de la estructura tridimensional de la trichialina like.*

Residue [A 18 :GLU] (-67.86, 31.27) in Allowed region
Residue [A 24 :ALA] (-142.87, 84.33) in Allowed region
Residue [A 31 :GLU] (-23.40, 119.57) in Allowed region
Residue [A 44 :GLN] (-140.58, 45.63) in Allowed region
Residue [A 46 :HIS] (-140.10, -8.79) in Allowed region
Residue [A 47 :ARG] (-151.29, 92.28) in Allowed region
Residue [A 54 :LYS] (-50.16, -67.65) in Allowed region
Residue [A 61 :ALA] (-116.55,-109.42) in Allowed region
Residue [A 62 :VAL] (-151.67, 3.78) in Allowed region
Residue [A 72 :GLU] (-53.82, -3.63) in Allowed region
Residue [A 73 :ARG] (-49.62, -21.18) in Allowed region
Residue [A 75 :GLU] (-74.77, 13.15) in Allowed region
Residue [A 91 :ILE] (-81.02, 17.53) in Allowed region
Residue [A 102 :MET] (-58.26, 178.99) in Allowed region
Residue [A 133 :ASN] (64.74, -62.28) in Allowed region
Residue [A 135 :MET] (-63.75, 93.36) in Allowed region
Residue [A 137 :GLN] (35.54, 35.08) in Allowed region
Residue [A 140 :GLU] (75.91, -48.55) in Allowed region
Residue [A 147 :GLU] (-46.59, -65.39) in Allowed region
Residue [A 160 :MET] (-68.33, 16.72) in Allowed region
Residue [A 164 :LEU] (-49.24, 110.46) in Allowed region
Residue [A 168 :ARG] (70.35, 67.71) in Allowed region
Residue [A 169 :ASP] (48.15,-104.66) in Allowed region
Residue [A 173 :THR] (-57.60, 167.52) in Allowed region
Residue [A 184 :LEU] (-48.30, -67.01) in Allowed region
Residue [A 198 :THR] (-68.19,-179.19) in Allowed region
Residue [A 221 :VAL] (59.84, -40.17) in Allowed region
Residue [A 229 :SER] (-139.90, 3.01) in Allowed region
Residue [A 230 :GLN] (-162.07, -24.57) in Allowed region
Residue [A 231 :ALA] (-166.94, 116.32) in Allowed region
Residue [A 254 :LEU] (28.18, 66.13) in Allowed region
Residue [A 256 :LEU] (67.43, -64.52) in Allowed region
Residue [A 263 :ASP] (-69.17, -64.14) in Allowed region

Residue [A 266 :GLU] (-37.63, 118.01) in Allowed region
Residue [A 269 :LEU] (-138.17,-167.62) in Allowed region
Residue [A 270 :ARG] (-151.05, 85.08) in Allowed region
Residue [A 273 :ALA] (-63.77, -73.30) in Allowed region
Residue [A 274 :ALA] (-60.26,-176.97) in Allowed region
Residue [A 292 :ARG] (-49.69, -67.86) in Allowed region
Residue [A 296 :GLU] (-67.82, 12.03) in Allowed region
Residue [A 297 :ILE] (-33.66, -59.57) in Allowed region
Residue [A 314 :GLU] (-141.46,-102.08) in Allowed region
Residue [A 345 :ASP] (-138.67, -31.84) in Allowed region
Residue [A 348 :GLU] (-35.80, -55.29) in Allowed region
Residue [A 367 :LYS] (-133.49, -25.13) in Allowed region
Residue [A 369 :GLU] (-66.20, 33.08) in Allowed region
Residue [A 370 :GLU] (-51.09, -65.99) in Allowed region
Residue [A 371 :LEU] (-154.90, 26.31) in Allowed region
Residue [A 375 :ARG] (-39.39, -44.33) in Allowed region
Residue [A 376 :LYS] (-51.15, -66.59) in Allowed region
Residue [A 388 :LEU] (-45.10, 101.87) in Allowed region
Residue [A 391 :LYS] (-35.16, -75.81) in Allowed region
Residue [A 399 :VAL] (-54.01, -78.72) in Allowed region
Residue [A 400 :THR] (-58.03, -66.11) in Allowed region
Residue [A 407 :ALA] (-83.12, 30.66) in Allowed region
Residue [A 409 :LEU] (-117.13,-139.81) in Allowed region
Residue [A 410 :GLN] (-143.42,-108.30) in Allowed region
Residue [A 425 :THR] (-63.39, 4.69) in Allowed region
Residue [A 426 :LYS] (-84.27, 23.38) in Allowed region
Residue [A 427 :ALA] (-27.29, -60.94) in Allowed region
Residue [A 434 :LEU] (-66.58, -69.50) in Allowed region
Residue [A 435 :HIS] (-55.12, -12.85) in Allowed region
Residue [A 436 :ALA] (-142.51, 47.79) in Allowed region
Residue [A 445 :ARG] (52.67, 74.49) in Allowed region
Residue [A 447 :GLU] (-128.17, 74.19) in Allowed region
Residue [A 452 :THR] (-56.50, 171.59) in Allowed region
Residue [A 453 :SER] (-144.00, 17.75) in Allowed region
Residue [A 455 :LYS] (65.24, -65.37) in Allowed region
Residue [A 458 :GLN] (-144.09, 44.25) in Allowed region
Residue [A 459 :GLU] (-157.18, -6.67) in Allowed region

Residue [A 462 :GLU] (-107.91,-167.65) in Allowed region
Residue [A 471 :THR] (-144.49, 44.92) in Allowed region
Residue [A 487 :GLU] (-76.46, 30.56) in Allowed region
Residue [A 489 :LYS] (-152.66, 50.78) in Allowed region
Residue [A 491 :THR] (-151.40, -41.51) in Allowed region
Residue [A 492 :THR] (-149.23, -19.06) in Allowed region
Residue [A 494 :VAL] (-64.46, 101.27) in Allowed region
Residue [A 499 :GLU] (-72.69, 64.70) in Allowed region
Residue [A 503 :LYS] (-131.65,-112.35) in Allowed region
Residue [A 504 :LEU] (-37.23, -57.76) in Allowed region
Residue [A 515 :ARG] (-74.24, -69.59) in Allowed region
Residue [A 517 :THR] (57.20, -61.98) in Allowed region
Residue [A 518 :ALA] (53.73, 10.75) in Allowed region
Residue [A 520 :GLN] (-46.24, 160.89) in Allowed region
Residue [A 522 :ARG] (56.41, -31.37) in Allowed region
Residue [A 533 :SER] (-45.95, -65.50) in Allowed region
Residue [A 549 :LEU] (-103.13, 45.03) in Allowed region
Residue [A 557 :GLU] (-52.59, 166.29) in Allowed region
Residue [A 558 :ALA] (60.72, -68.64) in Allowed region
Residue [A 570 :ALA] (-79.85, 52.10) in Allowed region
Residue [A 603 :LYS] (-79.87, 21.69) in Allowed region
Residue [A 604 :LYS] (-143.16, 31.08) in Allowed region
Residue [A 606 :GLN] (-33.62, -42.72) in Allowed region
Residue [A 608 :GLN] (-140.21, 44.31) in Allowed region
Residue [A 609 :GLU] (-66.58, -76.69) in Allowed region
Residue [A 611 :LYS] (-75.54, 47.66) in Allowed region
Residue [A 612 :VAL] (34.68, 39.34) in Allowed region
Residue [A 617 :GLU] (-131.71,-142.60) in Allowed region
Residue [A 628 :LYS] (-137.38, 72.42) in Allowed region
Residue [A 629 :ALA] (-126.77,-157.09) in Allowed region
Residue [A 630 :LYS] (-45.78, -72.45) in Allowed region
Residue [A 653 :GLU] (-157.71, 58.07) in Allowed region
Residue [A 658 :LYS] (-53.84, -70.72) in Allowed region
Residue [A 680 :SER] (53.68, 12.91) in Allowed region
Residue [A 708 :LYS] (-142.33, 14.38) in Allowed region
Residue [A 710 :GLU] (-55.30, 169.99) in Allowed region
Residue [A 714 :ALA] (-32.10, -60.18) in Allowed region

Residue [A 729 :LEU] (-139.25, 82.15) in Allowed region
Residue [A 731 :ASP] (-141.67, 73.28) in Allowed region
Residue [A 732 :ALA] (-62.23, 3.88) in Allowed region
Residue [A 748 :GLN] (-54.84, 168.98) in Allowed region
Residue [A 778 :GLU] (-46.47, -28.36) in Allowed region
Residue [A 796 :ALA] (-26.93, -54.92) in Allowed region
Residue [A 798 :SER] (-129.28, -51.23) in Allowed region
Residue [A 807 :LEU] (-65.91, -176.31) in Allowed region
Residue [A 808 :THR] (-132.64, -125.54) in Allowed region
Residue [A 818 :THR] (-105.22, 55.09) in Allowed region
Residue [A 819 :ARG] (-134.28, -39.36) in Allowed region
Residue [A 820 :ARG] (-54.45, 163.10) in Allowed region
Residue [A 822 :ARG] (-158.70, -161.01) in Allowed region
Residue [A 828 :LEU] (69.79, 83.37) in Allowed region
Residue [A 843 :ARG] (-91.39, 28.02) in Allowed region
Residue [A 845 :ARG] (-36.87, -75.02) in Allowed region
Residue [A 848 :GLU] (30.87, 45.36) in Allowed region
Residue [A 868 :ARG] (61.31, -45.55) in Allowed region
Residue [A 869 :VAL] (-56.97, -72.85) in Allowed region
Residue [A 873 :ALA] (-46.36, -64.65) in Allowed region
Residue [A 880 :GLN] (-71.94, 28.73) in Allowed region
Residue [A 885 :LEU] (-74.52, 52.14) in Allowed region
Residue [A 904 :ASP] (-156.97, -0.18) in Allowed region
Residue [A 907 :VAL] (-88.06, -70.46) in Allowed region
Residue [A 919 :SER] (-77.82, 13.68) in Allowed region
Residue [A 924 :LEU] (-68.97, 5.09) in Allowed region
Residue [A 928 :ASN] (-145.96, 38.04) in Allowed region
Residue [A 934 :SER] (-54.77, -13.94) in Allowed region
Residue [A 937 :THR] (-37.21, -60.35) in Allowed region
Residue [A 946 :ASP] (-57.88, -72.36) in Allowed region
Residue [A 959 :GLU] (-127.47, 73.01) in Allowed region
Residue [A 962 :GLU] (45.24, 14.40) in Allowed region
Residue [A 963 :THR] (39.91, 77.01) in Allowed region
Residue [A 966 :GLY] (-134.48, 50.07) in Allowed region
Residue [A 982 :VAL] (-90.32, 48.86) in Allowed region
Residue [A 983 :LYS] (-137.54, -30.75) in Allowed region
Residue [A 984 :SER] (-62.66, 171.81) in Allowed region

Residue [A 987 :ASP] (-118.71,-161.36) in Allowed region
Residue [A 999 :TRP] (-58.83, -4.59) in Allowed region
Residue [A1000 :LEU] (-51.00, -77.63) in Allowed region
Residue [A1013 :GLU] (26.66, 56.67) in Allowed region
Residue [A1014 :ALA] (-60.08, 0.67) in Allowed region
Residue [A1016 :ALA] (-162.24, -68.56) in Allowed region
Residue [A1018 :LEU] (-74.94, 63.77) in Allowed region
Residue [A1034 :PRO] (-52.08, 106.37) in Allowed region
Residue [A1045 :ARG] (76.11, 19.59) in Allowed region
Residue [A1053 :GLU] (-67.93,-175.82) in Allowed region
Residue [A1060 :VAL] (-49.15, -16.22) in Allowed region
Residue [A1064 :ASN] (-72.25, 45.95) in Allowed region
Residue [A1066 :GLU] (-68.76, 98.67) in Allowed region
Residue [A1070 :PHE] (-136.28,-134.29) in Allowed region
Residue [A1073 :ASP] (-93.06, 43.29) in Allowed region
Residue [A1074 :GLY] (-45.24, 101.83) in Allowed region
Residue [A1075 :LEU] (-80.43, 23.05) in Allowed region
Residue [A1080 :VAL] (-98.87,-163.01) in Allowed region
Residue [A1088 :LEU] (-72.77, 9.19) in Allowed region
Residue [A1094 :PRO] (-32.90, -42.03) in Allowed region
Residue [A1095 :ALA] (-60.71, -4.13) in Allowed region
Residue [A1097 :GLN] (-73.29, 70.42) in Allowed region
Residue [A1098 :LYS] (-74.55, 62.17) in Allowed region
Residue [A1106 :ALA] (-81.55, 38.48) in Allowed region
Residue [A1110 :SER] (-161.88, 103.96) in Allowed region
Residue [A1112 :ARG] (58.12, -27.61) in Allowed region
Residue [A1118 :ALA] (-80.72, 18.46) in Allowed region
Residue [A1120 :ALA] (-71.21, -18.19) in Allowed region
Residue [A1138 :LEU] (-61.91,-177.67) in Allowed region
Residue [A1148 :SER] (-62.00, 174.91) in Allowed region
Residue [A1156 :ARG] (-151.41, 30.12) in Allowed region
Residue [A1160 :ALA] (-65.88, 44.97) in Allowed region
Residue [A1161 :LEU] (-148.55, -21.70) in Allowed region
Residue [A1170 :ASN] (-122.34, 37.16) in Allowed region
Residue [A1177 :ALA] (-75.74, 17.17) in Allowed region
Residue [A1179 :ALA] (-115.94, 57.99) in Allowed region
Residue [A1182 :TYR] (-137.50, 48.92) in Allowed region

Residue [A1185 :ARG] (-58.16, -65.73) in Allowed region
Residue [A1195 :SER] (-146.75, 31.86) in Allowed region
Residue [A1196 :SER] (-68.90, 48.88) in Allowed region
Residue [A1200 :SER] (-149.55, -71.51) in Allowed region
Residue [A1211 :PRO] (-42.42, -61.41) in Allowed region
Residue [A 8 :GLU] (-60.62,-129.11) in Outlier region
Residue [A 9 :GLU] (-52.01, -84.03) in Outlier region
Residue [A 23 :GLU] (128.69, -34.89) in Outlier region
Residue [A 32 :GLU] (18.22, -0.07) in Outlier region
Residue [A 45 :LYS] (-56.80, 23.91) in Outlier region
Residue [A 90 :ALA] (134.16, 126.07) in Outlier region
Residue [A 103 :GLU] (37.74, -54.39) in Outlier region
Residue [A 127 :ALA] (98.11, 76.49) in Outlier region
Residue [A 139 :ARG] (-62.31, 48.03) in Outlier region
Residue [A 174 :ALA] (-53.53, 179.12) in Outlier region
Residue [A 175 :ARG] (60.53, -77.47) in Outlier region
Residue [A 199 :LEU] (45.98, -11.70) in Outlier region
Residue [A 222 :LYS] (99.20, 42.37) in Outlier region
Residue [A 255 :GLU] (-32.96, 178.91) in Outlier region
Residue [A 264 :GLU] (-166.55, -17.57) in Outlier region
Residue [A 275 :ALA] (39.42, -50.15) in Outlier region
Residue [A 294 :GLU] (-74.53,-118.54) in Outlier region
Residue [A 295 :THR] (31.37, -83.87) in Outlier region
Residue [A 315 :SER] (-171.59, -19.64) in Outlier region
Residue [A 316 :SER] (-24.41, 69.61) in Outlier region
Residue [A 330 :ASP] (-33.93, 69.51) in Outlier region
Residue [A 342 :ALA] (-45.19, -91.16) in Outlier region
Residue [A 343 :LEU] (-49.43, -94.65) in Outlier region
Residue [A 347 :GLU] (86.81, 86.97) in Outlier region
Residue [A 372 :ALA] (19.50, -81.68) in Outlier region
Residue [A 393 :LYS] (119.89, 141.43) in Outlier region
Residue [A 394 :GLU] (-31.48, 150.41) in Outlier region
Residue [A 396 :PRO] (-123.12,-162.88) in Outlier region
Residue [A 398 :GLY] (-132.99, 69.27) in Outlier region
Residue [A 401 :SER] (-35.75, -85.46) in Outlier region
Residue [A 446 :GLU] (55.73, 175.22) in Outlier region
Residue [A 456 :ARG] (-167.17, -12.72) in Outlier region

Residue [A 457 :THR] (25.11, 110.20) in Outlier region
Residue [A 470 :LEU] (-71.22, -98.86) in Outlier region
Residue [A 488 :TRP] (-35.15, -1.02) in Outlier region
Residue [A 490 :VAL] (-48.16, 65.62) in Outlier region
Residue [A 502 :THR] (102.82, 155.19) in Outlier region
Residue [A 547 :ALA] (-12.95, -53.23) in Outlier region
Residue [A 554 :ALA] (-60.08,-132.53) in Outlier region
Residue [A 555 :ALA] (46.83, 95.31) in Outlier region
Residue [A 556 :LYS] (150.67, -23.93) in Outlier region
Residue [A 568 :GLY] (-45.58, 91.92) in Outlier region
Residue [A 572 :ALA] (5.24, -63.14) in Outlier region
Residue [A 610 :LEU] (41.79, -11.64) in Outlier region
Residue [A 618 :ALA] (85.25, 77.25) in Outlier region
Residue [A 654 :LEU] (81.83,-148.66) in Outlier region
Residue [A 682 :ALA] (58.77, 125.44) in Outlier region
Residue [A 712 :GLU] (121.15, -32.68) in Outlier region
Residue [A 713 :THR] (19.76, 95.34) in Outlier region
Residue [A 747 :GLN] (-67.46, 26.28) in Outlier region
Residue [A 753 :ASN] (-45.54, 92.58) in Outlier region
Residue [A 754 :SER] (47.36, -6.18) in Outlier region
Residue [A 784 :ARG] (44.48, -69.02) in Outlier region
Residue [A 786 :GLU] (48.21, -38.77) in Outlier region
Residue [A 795 :ALA] (27.10,-168.92) in Outlier region
Residue [A 797 :MET] (-10.99, -68.57) in Outlier region
Residue [A 821 :SER] (29.12, -3.27) in Outlier region
Residue [A 825 :ALA] (-174.62, 0.27) in Outlier region
Residue [A 867 :MET] (113.99, 108.79) in Outlier region
Residue [A 877 :ARG] (132.93, -41.48) in Outlier region
Residue [A 879 :ILE] (-48.83, 97.53) in Outlier region
Residue [A 881 :ALA] (28.69, 37.96) in Outlier region
Residue [A 886 :LYS] (-54.00, 51.32) in Outlier region
Residue [A 887 :ARG] (9.47, 22.04) in Outlier region
Residue [A 888 :GLN] (29.10, 34.06) in Outlier region
Residue [A 903 :ARG] (18.88, 18.67) in Outlier region
Residue [A 908 :ALA] (46.09, 174.69) in Outlier region
Residue [A 922 :SER] (-108.70, 21.42) in Outlier region
Residue [A 923 :PRO] (-97.62, -47.23) in Outlier region

Residue [A 925 :ALA] (-130.53, 5.31) in Outlier region
Residue [A 929 :ALA] (45.11, -99.29) in Outlier region
Residue [A 935 :ALA] (-154.95,-106.17) in Outlier region
Residue [A 936 :PRO] (13.47, -34.59) in Outlier region
Residue [A 948 :GLU] (-65.53, -84.65) in Outlier region
Residue [A 950 :THR] (-104.26, -39.48) in Outlier region
Residue [A 988 :ALA] (128.74, 163.25) in Outlier region
Residue [A1033 :ALA] (-111.71, -41.75) in Outlier region
Residue [A1061 :THR] (-21.97, -37.37) in Outlier region
Residue [A1063 :THR] (151.32, 139.96) in Outlier region
Residue [A1079 :SER] (30.88, 19.88) in Outlier region
Residue [A1081 :LEU] (52.76, -79.21) in Outlier region
Residue [A1082 :GLY] (-24.58, -57.47) in Outlier region
Residue [A1083 :PRO] (-44.98, -84.57) in Outlier region
Residue [A1107 :SER] (-47.49, 84.61) in Outlier region
Residue [A1111 :PRO] (-32.79,-179.99) in Outlier region
Residue [A1139 :TYR] (48.36, -70.90) in Outlier region
Residue [A1142 :ASP] (-43.74, -7.74) in Outlier region
Residue [A1143 :LEU] (-64.40, -14.98) in Outlier region
Residue [A1146 :PRO] (-35.56, 98.02) in Outlier region
Residue [A1149 :PRO] (-21.74, -13.31) in Outlier region
Residue [A1158 :ALA] (-159.94, -68.48) in Outlier region
Residue [A1172 :PHE] (-52.10,-101.26) in Outlier region
Residue [A1189 :GLU] (-83.53,-105.96) in Outlier region
Residue [A1201 :SER] (112.67, -25.83) in Outlier region
Residue [A1202 :PRO] (-60.84, 9.97) in Outlier region
Residue [A1210 :SER] (-128.83, -33.30) in Outlier region

Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 930 (76.7%)

Number of residues in allowed region (~2.0% expected): 186 (15.3%)

Number of residues in outlier region : 96 (7.9%)

Tabla 8. *Proteínas identificadas y cuantificadas por espectrometría de masas en el extracto de citoesqueleto subpelicular de T. gondii cepa RH.*

Clasificación	Proteína descripción	Clave de identificación	UnProt ID	Puntuación	Peso molecular (kDa)	Cantidad de proteína en columna (fmol)	Porcentaje de cobertura	Número de moléculas
GRA	Dense-Granule Antigen Dg32	TGGT1_222170	A0A125YI16	289.1427	33.7514413	3.3746	12.67	337460000
	Dense Granule Protein Dg32	TGGT1_297880	A0A125YME3	578.2881	24.1531216	7.1376	30.14	713760000
	Dense Granule Protein Gra8	TGGT1_254720	A0A125YYI5	743.7713	28.5272934	41.1947	16.48	4119470000
	Dense Granule Protein Gra5	TGGT1_286450	A0A125YQQ2	2002.736	12.9766248	25.5158	11.67	2551580000
	Dense Granule Protein Gra14	TGGT1_239740	A0A125YJW1	857.0988	44.8101698	16.9324	31.86	1693240000
	Dense Granule Protein Gra7	TGGT1_203310	A0A125YVB8	15914.12	25.9148052	117.157	50	11715700000
	Dense Granule Protein Gra1	TGGT1_270250	A0A125YRV6	526.6394	20.2064376	7.0573	23.16	705730000
	Dense Granule Protein Gra12	TGGT1_288650	S7VY87	13329.98	48.1408617	229.8343	53.44	22983430000
	Dense Granule Protein Gra3	TGGT1_227280	A0A125YJQ7	1367.168	24.2989846	31.6741	17.57	3167410000
	Dense Granule Protein Gra2	TGGT1_227620	S7UXS8	521.6145	19.8995688	2.1036	15.68	210360000
	Dense Granule Protein Gra4	TGGT1_310780	S7UT91	3497.059	36.3976587	37.1133	42.32	3711330000
Dense Granule Protein Gra9	TGGT1_251540	A0A125YWK4	2015.359	35.5381232	13.4286	30.82	1342860000	
Proteínas de choque térmico	Heat Shock Protein Hsp70	TGGT1_273760	A0A125YP12	6602.058	72.7491539	70.7747	43.93	7077470000
	Chaperonin Gros Protein	TGGT1_273960	S7V3I2	499.916	40.106305	5.378	27.01	537800000
	Heat Shock Protein	TGGT1_324600	S7V3T7	11390.12	20.4373826	115.1636	69.19	11516360000
	Heat Shock Protein Hsp90	TGGT1_288380	A0A125YVB6	2192.766	82.3325369	31.5267	27.12	3152670000
	Heat Shock Protein Hsp29	TGGT1_289600	A0A125YQI3	193.9194	29.8204247	1.6001	18.38	160010000
	Chaperonin Protein Bip	TGGT1_311720	A0A125YJG4	7692.64	73.4243321	72.0531	44.91	7205310000
	Heat Shock Protein Hsp21	TGGT1_312600	S7UTP6	1931.602	21.4070286	2.5317	11.79	253170000
Hipotéticas	Hipotética	TGGT1_293360	A0A125YR46	1931.974	26.9230216	9.6206	53.5	962060000
	Hipotética	TGGT1_294790	A0A125YPS7	1015.107	38.0420882	3.7106	12.25	371060000
	Hipotética	TGGT1_295360	A0A125YNR7	2792.547	29.8350739	21.4427	36.57	2144270000
	Hipotética	TGGT1_207370	S7VYC5	129.2502	143.7940403	2.2259	6.63	222590000
	Hipotética	TGGT1_207720	A0A125YHQ3	255.251	178.365044	3.9993	10.01	399930000
	Hipotética	TGGT1_208830	A0A125YGU3	1388.278	55.0677659	8.7436	23.76	874360000

Hipotética	TGGT1_209720	A0A125YSM3	3674.157	23.8725949	29.9446	18.81	2994460000
Hipotética	TGGT1_220930	A0A125YM44	266.1934	74.9240466	6.7308	8.59	673080000
Hipotética	TGGT1_220950	S7ULI1	10152.47	35.6771632	76.3844	30.24	7638440000
Hipotética	TGGT1_223040	A0A125YL08	603.8684	27.6886712	4.89	31.8	489000000
Hipotética	TGGT1_297070	A0A125YMC 5	4367.332	58.2735953	36.1189	22.35	3611890000
Hipotética	TGGT1_297460	S7VTQ2	720.7498	48.187059	3.1874	15.38	318740000
Hipotética	TGGT1_297745	S7UJY5	581.3203	416.43741	7.3401	22.18	734010000
Hipotética	TGGT1_297810	S7UKR8	2907.296	29.7969637	39.2956	39.1	3929560000
Hipotética	TGGT1_297830	S7VTK3	192.9276	140.888012 3	2.6425	7.63	264250000
Hipotética	TGGT1_253370	S7ULP2	185.3066	218.080560 6	1.863	13.12	186300000
Hipotética	TGGT1_254570	S7VVM5	441.638	225.072974 9	13.7516	19.08	1375160000
Hipotética	TGGT1_275860	S7UNG6	938.6041	43.5333214	7.6738	16.71	767380000
Hipotética	TGGT1_211030	A0A125YG58	609.2853	22.6148159	2.0842	25.65	208420000
Hipotética	TGGT1_301130	A0A125YPA9	1112.059	13.849753	16.9332	13.39	1693320000
Hipotética	TGGT1_301420	S7UHP2	2281.26	29.8361841	14.1318	38.02	1413180000
Hipotética	TGGT1_319340	S7UK33	682.478	52.9159935	8.0298	20.37	802980000
Hipotética	TGGT1_319510	S7VSU2	331.9873	30.2085179	4.9805	22.54	498050000
Hipotética	TGGT1_213030	S7UPA7	558.59	35.3410177	3.0246	30.56	302460000
Hipotética	TGGT1_213670	S7W3J7	267.9049	85.950704	27.0084	12.28	2700840000
Hipotética	TGGT1_213910	S7UPK2	184.3061	44.0099636	5.1532	19.11	515320000
Hipotética	TGGT1_220240	S7UH01	1154.893	54.2247399	23.3143	31.56	2331430000
Hipotética	TGGT1_220390	S7UH87	372.6906	29.8341235	3.3114	12.77	331140000
Hipotética	TGGT1_220510	S7VPF1	242.3769	64.3072417	4.4279	10.62	442790000
Hipotética	TGGT1_283510	S7W2S3	1886.363	35.0841423	14.5347	19.11	1453470000
Hipotética	TGGT1_285510	A0A125YUZ2	328.2667	18.8400269	3.7656	25.3	376560000
Hipotética	TGGT1_286230	S7VWP0	168.2162	282.827157 9	3.0429	8.62	304290000
Hipotética	TGGT1_286530	A0A125YG08		25.6646282	17.1365	30.73	1713650000
Hipotética	TGGT1_286580	S7UP07	2294.73	108.016361 1	44.1787	34.35	4417870000
Hipotética	TGGT1_286600	S7UP66	1216.027	43.5735513	15.4792	22.16	1547920000
Hipotética	TGGT1_287270	S7UP79	261.9441	75.8390139	6.1113	18.04	611130000
Hipotética	TGGT1_239400	S7URX0	345.3389	135.018754 2	6.2494	16.6	624940000
Hipotética	TGGT1_239800	S7W6E8	1266.793	34.6536113	10.5497	19.09	1054970000
Hipotética	TGGT1_240060	S7W054	354.6641	89.1860373	9.1761	13.39	917610000
Hipotética	TGGT1_240510	S7W0B0	135.7818	136.915198	4.1358	8.72	413580000
Hipotética	TGGT1_240570	S7USA4	313.6787	58.1441319	4.3743	16.47	437430000
Hipotética	TGGT1_240810	A0A125YQS5	127.2182	61.9471797	1.7827	7.6	178270000
Hipotética	TGGT1_243200	S7USR3	155.9867	134.104813 1	2.193	6.52	219300000
Hipotética	TGGT1_243460	S7VTN5	134.4688	211.259119 2	3.482	9.85	348200000

Hipotética	TGGT1_201760	A0A125YUC8	452.1085	37.8755046	5.2956	18.15	529560000
Hipotética	TGGT1_201800	S7UVZ7	1012.064	28.7555596	7.0402	23.6	704020000
Hipotética	TGGT1_202200	S7UVE2	369.6356	87.789082	4.0975	22.7	409750000
Hipotética	TGGT1_203370	S7W3Y0	447.7674	81.678664	7.7649	23.13	776490000
Hipotética	TGGT1_203600	S7UVX0	481.9273	48.1174418	4.9372	20.96	493720000
Hipotética	TGGT1_204340	A0A125YZ08	606.3533	97.9822972	5.519	16.42	551900000
Hipotética	TGGT1_205570	S7UU30	832.4742	68.7971834	8.0662	23.45	806620000
Hipotética	TGGT1_280370	S7UUK8	388.8871	82.9215689	6.898	28.91	689800000
Hipotética	TGGT1_282180	A0A125YV76	394.287	35.3667417	1.4507	12.9	145070000
Hipotética	TGGT1_256000	A0A125YGT4	686.6395	26.4330692	3.3995	20.18	339950000
Hipotética	TGGT1_256030	A0A125YHL4	1132.212	29.5075743	11.19	37.5	1119000000
Hipotética	TGGT1_258470	A0A125YLP8	3950.903	31.9359107	37.8021	41.55	3780210000
Hipotética	TGGT1_258500	S7W7I8	590.5237	41.454717	4.0929	24.73	409290000
Hipotética	TGGT1_258870	S7UYU8	2223.759	61.6819011	6.8352	36.62	683520000
Hipotética	TGGT1_258870	S7W7E3	2505.172	52.3396099	27.3676	16.53	2736760000
Hipotética	TGGT1_258970	S7UZ14	141.1051	329.971191	5.1735	11.48	517350000
Hipotética	TGGT1_259630	S7UY65	2085.866	18.3404995	18.5983	45.63	1859830000
Hipotética	TGGT1_260180	A0A125YTD7	526.7928	18.0546036	9.3369	33.12	933690000
Hipotética	TGGT1_260520	S7UY65	170.6373	77.3485483	2.3997	11.32	239970000
Hipotética	TGGT1_263320	S7WDJ3	215.1238	42.1944561	3.1541	10.92	315410000
Hipotética	TGGT1_263630	S7UXR8	1863.985	15.544814	13.3535	22.06	1335350000
Hipotética	TGGT1_263990	A0A125YPS4	613.6906	15.5204748	5.1902	54.48	519020000
Hipotética	TGGT1_264040	S7UXU8	3827.044	24.7754369	42.3294	46.82	4232940000
Hipotética	TGGT1_200360	A0A125YRJ9	2085.34	20.3024045	5.5941	46.24	559410000
Hipotética	TGGT1_229030	S7V231	917.0493	25.6260953	9.3237	40.79	932370000
Hipotética	TGGT1_229920	S7V2H1	3422.683	35.0122728	34.1877	41.69	3418770000
Hipotética	TGGT1_230160	A0A125YR22	10702.74	15.9018083	105.273	72.54	1052738000
Hipotética	TGGT1_230340	S7V2D1	1021.858	103.125740	7.5824	37.2	758240000
Hipotética	TGGT1_230350	S7V2E0	342.1317	140.106368	8.0209	11.88	802090000
Hipotética	TGGT1_230850	S7V2A2	1437.17	51.1722518	28.096	34.66	2809600000
Hipotética	TGGT1_230940	S7V277	405.4709	155.277200	8.4701	18.45	847010000
Hipotética	TGGT1_231160	S7WIF1	4544.213	18.5237527	109.728	10.67	1097288000
Hipotética	TGGT1_231410	S7V2T0	2073.222	65.1279513	30.2265	33.63	3022650000
Hipotética	TGGT1_232130	S7WBP6	1768.728	48.868831	43.2587	29.39	4325870000
Hipotética	TGGT1_232260	A0A125YGI4	647.0828	32.7415572	5.9467	16.99	594670000
Hipotética	TGGT1_233220	S7WJB9	180.2437	160.523840	2.0641	6.57	206410000
Hipotética	TGGT1_268835	S7V493	964.5734	76.7487318	19.9767	23.62	1997670000
Hipotética	TGGT1_269290	S7V5I3	162.7691	507.476695	2.7919	7.2	279190000

Hipotética	TGGT1_270270	A0A125YM81	387.6959	41.8274352	6.1702	13.26	617020000
Hipotética	TGGT1_270930	S7V4E6	135.414	318.958983	31.6902	8.83	3169020000
Hipotética	TGGT1_271930	S7V4M0	4388.45	26.4293898	20.7807	40.17	2078070000
Hipotética	TGGT1_272520	A0A125YMT7	910.0222	44.2218536	7.1191	31.92	711910000
Hipotética	TGGT1_266080	S7VW43	973.7046	82.1942351	10.7735	20.74	1077350000
Hipotética	TGGT1_266630	A0A125YLZ4	365.8951	67.9479309	8.514	16.84	851400000
Hipotética	TGGT1_267090	S7UHD4	452.2578	60.891197	4.7522	13.32	475220000
Hipotética	TGGT1_267500	A0A125YWB	890.6359	25.92517	10.5092	22.61	1050920000
Hipotética	TGGT1_288000	S7UPE0	186.6486	329.632868	5.3822	14.01	538220000
Hipotética	TGGT1_289540	A0A125YZN8	1811.874	100.760385	23.2224	31.48	2322240000
Hipotética	TGGT1_289970	S7UPY4	424.7201	24.4885816	3.5884	19.4	358840000
Hipotética	TGGT1_290030	S7UQ82	1385.003	26.6796668	10.3273	31.88	1032730000
Hipotética	TGGT1_290700	S7W4F0	2445.721	34.58878	7.7504	18.91	775040000
Hipotética	TGGT1_306670	S7VQY2	1341.599	26.1757083	23.4882	38.64	2348820000
Hipotética	TGGT1_212300	A0A125YNH9	2413.137	75.9621266	64.1419	43.78	6414190000
Hipotética	TGGT1_214220	S7UR95	3182.283	23.5278821	29.5233	40.57	2952330000
Hipotética	TGGT1_214575	S7W5P8	2547.438	10.566825	9.7009	32.61	970090000
Hipotética	TGGT1_214930	A0A125YMA7	938.6014	15.2613262	8.9949	68.84	899490000
Hipotética	TGGT1_215430	A0A125YME6	408.3556	27.6117481	2.3974	22.13	239740000
Hipotética	TGGT1_225120	S7UW30	311.1153	16.1657718	1.6996	16.44	169960000
Hipotética	TGGT1_225160	S7UWM7	389.0817	45.5866089	6.5112	13.72	651120000
Hipotética	TGGT1_225690	S7UXE2	214.6783	196.555922	7.1832	10.63	718320000
Hipotética	TGGT1_226380	S7W5P1	417.6468	42.7765297	6.546	29.89	654600000
Hipotética	TGGT1_226570	A0A125YGY8	766.7662	15.2239638	13.9679	22.3	1396790000
Hipotética	TGGT1_226580	A0A125YY97	271.308	43.1381808	3.2746	20.53	327460000
Hipotética	TGGT1_226980	A0A125YGS8	350.3249	25.4957386	5.7498	6.61	574980000
Hipotética	TGGT1_227060	S7UWX0	266.1221	141.131403	3.1464	9.98	314640000
Hipotética	TGGT1_228100	S7WD55	153.5507	141.351921	2.8158	7.91	281580000
Hipotética	TGGT1_228630	S7W631	1021.967	35.2576644	6.4806	38.72	648060000
Hipotética	TGGT1_234380	S7UVT9	366.463	38.7681326	4.6793	28.53	467930000
Hipotética	TGGT1_235340	S7URJ0	810.8085	78.5929284	6.1248	21.67	612480000
Hipotética	TGGT1_236950	A0A125YVX4	1034.064	12.7743427	5.291	44.64	529100000
Hipotética	TGGT1_237010	S7UQL1	191.8819	72.6613225	1.7231	13.95	172310000
Hipotética	TGGT1_237180	S7UQY0	2432.804	29.2405835	6.5574	24.31	655740000
Hipotética	TGGT1_308860	S7UT19	1801.561	69.9659893	46.2283	21.41	4622830000
Hipotética	TGGT1_308970	S7US29	656.9077	38.498128	4.4535	23.39	445350000
Hipotética	TGGT1_309600	S7UT46	2188.857	107.030988	44.7704	38.85	4477040000
Hipotética	TGGT1_309760	S7US82	2901.464	34.6406509	16.9153	45.08	1691530000

Hipotética		TGGT1_310118	S7UT94	162.8374	63.3632972	0.7246	10.28	72460000
Hipotética		TGGT1_310180	S7W180	1638.285	10.416748	10.2236	26.09	1022360000
Hipotética		TGGT1_311030	S7W237	359.8493	406.286348	5.6635	17.71	566350000
Hipotética		TGGT1_311230	S7UU25	599.0482	499.486586	37.0284	16.62	3702840000
Hipotética		TGGT1_312150	S7UST7	410.2504	61.1256062	10.6948	13.4	1069480000
Hipotética		TGGT1_313080	S7W1K2	301.8872	50.0973488	2.7249	16.48	272490000
Hipotética		TGGT1_313380	A0A125YKB3	6443.371	32.0260399	108.501	38.69	1085010000
Hipotética		TGGT1_313430	S7UT68	91.7485	599.499517	34.3151	6.05	3431510000
Hipotética		TGGT1_313640	A0A125YXY4	855.1679	22.8154284	4.9635	13.93	496350000
Hipotética		TGGT1_314080	S7UTH7	598.0527	20.8654971	6.6348	20.11	663480000
Hipotética		TGGT1_314260	S7W2E8	721.4357	24.125242	3.4185	17.37	341850000
Hipotética		TGGT1_314750	S7W1C1	537.8301	50.3961195	5.4762	17.27	547620000
Hipotética		TGGT1_315610	A0A125YNL0	8336.995	15.9710306	6.5386	23.42	653860000
Hipotética		TGGT1_315750	S7W143	1782.229	25.8769704	5.74	20.78	574000000
Hipotética		TGGT1_316255	S7UME7	367.6583	10.2038951	4.3625	27.91	436250000
Hipotética		TGGT1_316340	S7ULE0	637.2413	26.9067296	5.7872	27.98	578720000
Hipotética		TGGT1_217510	S7V1I0	967.2358	42.3998526	11.6762	25.26	1167620000
Hipotética		TGGT1_217530	S7WHL7	236.7619	64.0984787	3.3873	11.79	338730000
Hipotética		TGGT1_217680	S7V1J5	1080.654	243.606868	33.715	37.05	3371500000
Hipotética		TGGT1_218940	A0A125YLR0	251.6686	35.4815959	5.5213	13.19	552130000
Hipotética		TGGT1_246220	S7V0S5	392.5747	87.0756133	8.6234	19.98	862340000
Hipotética		TGGT1_246580	S7W9K2	2315.663	43.0490427	33.0739	31.07	3307390000
Hipotética		TGGT1_246720	S7WH01	241.8269	56.3692146	2.6471	8.37	264710000
Hipotética		TGGT1_247440	S7V1I0	568.6635	40.300548	2.962	25.93	296200000
Hipotética		TGGT1_247770	S7W9X4	352.6239	19.3032871	5.0429	43.11	504290000
Hipotética		TGGT1_248120	S7V1Q1	354.8853	101.790080	5.2601	8.21	526010000
Hipotética		TGGT1_248740	S7V131	520.5206	140.539379	17.4313	15.28	1743130000
Hipotética		TGGT1_249990	S7V0P7	3305.241	93.1149708	32.5351	47.02	3253510000
Hipotética		TGGT1_250820	S7V028	419.0076	121.762923	7.4519	20.5	745190000
Hipotética		TGGT1_276890	S7UZS6	413.7491	131.246683	7.3935	21.12	739350000
Hipotética		TGGT1_278780	S7W8B0	1084.023	46.4708443	8.4724	32.33	847240000
Hipotética		TGGT1_299780	A0A125YGU0	564.2404	59.5912999	12.8253	15.23	1282530000
Hipotética		TGGT1_279100	S7UGI9	10771.75	48.1655127	13.2537	49.89	1325370000
Hipotética		TGGT1_224960	S7UW55	269.0126	28.7908658	2.3544	27.94	1418055120
Relacionada a membrana	Spfh Domain / Band 7 Family Protein	TGGT1_222210	S7VTY9	574.8986	47.8652549	8.3291	31.14	832910000
	Rab11B	TGGT1_320480	A0A125YTY6	1263.614	24.9712059	3.5759	10.18	357590000

Endomembrane Protein 70 Subfamily Protein	TGGT1_283730	A0A125YSL5	207.1857	77.083506	2.6492	4.45	264920000
Membrane Protein	TGGT1_242840	A0A125YNN8	495.738	13.9609446	11.7477	21.85	1174770000
Glideosome-Associated Protein With Multiple-Membrane Spans Gapm2B	TGGT1_206690	A0A125YVU7	743.22	47.1311338	4.7962	23	479620000
Apical Membrane Antigen Ama1	TGGT1_255260	S7WI53	952.041	64.1041999	15.659	21.97	1565900000
Transporter_Major Facilitator Family Protein	TGGT1_257530	S7W7U8	547.9553	55.4437992	4.422	14.48	442200000
Photosensitized Ina-Labeled Protein Phil1	TGGT1_258410	A0A125YLU9	2511.478	19.0718511	12.7999	30.3	1279990000
Membrane Protein Ftsh1	TGGT1_259260	A0A125YKJ7	241.1719	137.564516 3	10.2827	14.72	1028270000
Kelch Repeat And K+ Channel Tetramerisation Domain Containing Protein	TGGT1_262150	S7WDW6	629.9297	89.8979602	9.9565	18.22	995650000
Cg8 Family Protein	TGGT1_262640	A0A125YRH5	498.6506	23.8740773	5.9251	12.25	592510000
Eukaryotic Porin Protein T	TGGT1_263300	A0A125YUJ9	11275.07	31.6370852	102.686 7	58.28	1026867000 0
Protein Translocation Complex_Sec61 Gamma Subunit	TGGT1_230380	S7WB99	428.0584	17.0282427	3.8323	28.86	383230000
Spfh Domain / Band 7 Family Protein	TGGT1_233100	A0A125YWW 3	5151.589	32.1750724	32.1681	36.9	3216810000
Sag-Related Sequence Srs29B	TGGT1_233460	A0A125YG48	5246.716	35.6274539	100.882 1	40.48	1008821000 0
Mag1 Protein	TGGT1_270240	S7V482	4039.002	49.4945657	43.3523	28.1	4335230000
Sag-Related Sequence Srs34A	TGGT1_271050	A0A125YVU5	1475.718	19.3229414	50.2984	43.55	5029840000
Glideosome-Associated Protein With Multiple-Membrane Spans Gapm3	TGGT1_271970	A0A125YP90	1543.992	34.7387143	9.4104	12.9	941040000
Beta-Cop	TGGT1_266990	S7UHC3	131.5023	123.296294 1	3.0239	15.32	302390000
Multi-Pass Transmembrane Protein	TGGT1_267620	S7UGQ1	670.8712	58.4256485	8.8321	23.82	883210000
Snare Associated Golgi Protein So=Protein_Coding Is_Pseudo=False	TGGT1_279370	S7UGL9	527.5937	46.7232163	11.856	7.35	1185600000
Gap45 Protein	TGGT1_223940	A0A125YXT6	1081.448	27.6601556	22.7117	24.49	2271170000
Sag-Related Sequence Srs67	TGGT1_226860	S7W5K4	532.2401	23.3535794	3.5616	12.86	356160000

	Inner Membrane Complex Protein Imc2A	TGGT1_228170	S7UX86	552.7444	182.963276 9	30.8738	21.12	3087380000
	Nmda Receptor Glutamate-Binding Chain	TGGT1_309560	S7US63	2032.549	29.5038518	27.8305	11.32	2783050000
	Lsm Domain-Containing Protein	TGGT1_309740	A0A125YS34	297.5568	14.4679967	2.9444	35.88	294440000
	Membrane Occupation And Recognition Nexus Protein Morn1	TGGT1_310440	A0A125YJY7	1280.619	41.0037287	7.1339	43.25	713390000
	Apicoplast-Associated Thioredoxin Family Protein Atrx1	TGGT1_312110	S7UTI6	228.9031	87.5900064	2.7755	14.68	277550000
	Sag-Related Sequence Srs52A So=Protein_Coding Is_Pseudo=False	TGGT1_315320	S7UMK1	289.6311	34.9202813	13.2049	25.23	1320490000
	Protein Phosphatase 2C Domain- Containing Protein	TGGT1_218590	S7WA48	165.2721	98.6455793	1.1894	4.88	118940000
	Multi-Pass Transmembrane Protein	TGGT1_219270	A0A125YRY2	1431.064	43.2616273	23.2139	19.02	2321390000
	Gtpase Rab7	TGGT1_248880	S7V0V9	440.6821	48.5601936	4.1266	28.24	412660000
	Lsm Domain-Containing Protein	TGGT1_300280	S7UFN1	845.8066	17.9402549	2.9158	30.18	291580000
	Sag-Related Sequence Srs57	TGGT1_308020	A0A125YU72	625.8264	42.5716558	12.4075	14.03	1240750000
	GAP40 protein	TGGT1_249850	A0A125YP05	148.3532	43.6519554	82.1524	4.16	8215240000
Metabolismo	Glucose-6-Phosphate 1- Dehydrogenase	TGGT1_294200	A0A125YWK 6	2405.803	62.9646506	23.0367	44.29	2303670000
	Acetyl-Coa Carboxylase Acc1	TGGT1_221320	S7VU47	244.2646	288.949733 6	4.5463	18.82	454630000
	Udp-Galactose Transporter Family Protein	TGGT1_254580	S7UMX4	155.3138	45.9221402	2.4407	9.69	244070000
	Adp Ribosylation Factor Arf1	TGGT1_276140	S7UMN8	169.661	62.9989597	4.0159	7.8	401590000
	P-Type Atpase Of Unknown Pump Specificity (Type V) Protein	TGGT1_318460	A0A125YKZ3	87.3884	164.542403 3	2.9655	1.42	296550000
	2-Oxo Acid Dehydrogenases Acyltransferase (Catalytic Domain) Domain-Containing Protein	TGGT1_319920	S7UK76	1425.785	70.9740487	27.8048	31.69	2780480000
	Phosphoribosylpyrophosphate Synthetase	TGGT1_220100	S7VVA0	959.6885	61.6098397	24.8102	24.06	2481020000

Atp Synthase F1_ Delta Subunit Protein	TGGT1_284540	A0A125YKF8	2934.865	27.6920678	24.5548	35.32	2455480000
3-Oxo-5-Alpha-Steroid 4-Dehydrogenase	TGGT1_285240	A0A125YK59	395.0176	40.4437829	28.2619	7.2	2826190000
Redoxin Domain-Containing Protein	TGGT1_286630	S7VWS3	2640.907	31.5202196	9.212	17.12	921200000
Protein Disulfide-Isomerase Domain-Containing Protein	TGGT1_238040 A	S7W691	291.1895	127.054162 6	4.5453	11.15	454530000
Camp-Dependent Protein Kinase Regulatory Subunit	TGGT1_242070	A0A125YLM5	268.3787	42.9676658	4.825	21.3	482500000
Fatty Acid Elongase	TGGT1_242380	S7W0L5	203.7129	39.8774492	1.8987	14.86	189870000
Protein Phosphatase 2C Domain-Containing Protein	TGGT1_202610	S7UUM4	206.7258	94.3898848	0.9656	13.26	96560000
Pyruvate Dehydrogenase Complex Subunit Pdh-E2	TGGT1_206610	S7UTU2	434.6635	96.9697651	10.3885	31.54	1038850000
Poly(Adp-Ribose) Glycohydrolase	TGGT1_280380	S7W2K3	671.5432	62.4640464	6.8521	27.67	685210000
Selenide_ Water Dikinase	TGGT1_280560	S7UU79	282.7567	140.098833 9	5.0729	14.95	507290000
Arginine Decarboxylase	TGGT1_280700	S7UTQ6	256.8883	136.641399	4.3171	13.39	431710000
Protein Phosphatase Pp2C-Hn	TGGT1_282055	S7UW79	912.2227	52.3466397	17.3001	40.38	1730010000
Lectin Family Protein	TGGT1_258950	S7UYG3	815.7068	70.432888	24.0868	26.63	2408680000
Orotate Phosphoribosyltransferase	TGGT1_259660	A0A125YGM 4	351.5442	31.6502127	3.192	33.57	319200000
Phosphatidyl Serine Synthase	TGGT1_261480	S7UXZ9	295.1465	61.7751074	2.8083	14.07	280830000
Cdp-Alcohol Phosphatidyltransferase Superfamily Protein	TGGT1_261760	S7UYP1	445.9698	49.9938955	3.7136	9.13	371360000
Atp Synthase Beta Subunit Atp-B	TGGT1_261950	A0A125YYY4	10742.32	60.1447584	109.477 4	46.61	1094774000 0
Lipase	TGGT1_262400	S7WDX0	552.2042	156.469573 1	10.4941	16.96	1049410000
Peroxiredoxin Prx3	TGGT1_230410	S7V2Y3	192.5362	30.7481792	5.1295	18.73	512950000
Protein Kinase	TGGT1_231070	S7WIG3	113.7912	143.019435 4	2.399	9.71	239900000
Atp Synthase F1 Gamma Subunit	TGGT1_231910	A0A125YUHO	1965.271	34.7582383	13.2718	49.04	1327180000
Enolase 2	TGGT1_268850	A0A125YLV4	257.453	52.7982425	5.8227	6.74	582270000
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gapdh2	TGGT1_269190	S7WDK9	583.6594	106.214730 9	13.1836	25.23	1318360000

Phosphatidylserine Decarboxylase So=Protein_Coding Is_Pseudo=False	TGGT1_269920	F6N7K6	415.215	108.814899 6	4.283	15.91	428300000
Protein Phosphatase 2C Domain- Containing Protein	TGGT1_270320	A0A125YP66	238.451	58.903456	3.3902	20.26	339020000
Pyruvate Dehydrogenase Complex Subunit Pd-He1Beta	TGGT1_272290	S7V366	1806.743	50.330562	8.9046	19.36	890460000
Pci Domain-Containing Protein	TGGT1_273520	A0A125YQR1	1168.188	67.9118597	13.573	24.46	1357300000
2-Oxoglutarate/Malate Translocase Omt	TGGT1_274060	S7V4E3	3373.251	35.2999469	11.821	55.11	1182100000
Fad Malate-Dehydrogenase (Mdh-Fad)	TGGT1_288500	S7VY67	211.2638	60.9640285	2.5743	10.18	257430000
Ubiquinol-Cytochrome C Reductase	TGGT1_288750	A0A125YYJ3	1805.192	26.7416312	17.7726	49.57	1777260000
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gapdh1	TGGT1_289690	S7UQ54	227.4021	54.0238843	12.04	9.41	1204000000
Wd-40 Repeat Protein	TGGT1_290850	A0A125YRT1	632.8618	59.1070128	3.7283	25.53	372830000
Guanylate-Binding Protein_N- Terminal Domain-Containing Protein	TGGT1_304990	S7UIA3	491.2986	143.689729 1	10.5833	18.81	1058330000
Pyruvate Dehydrogenase Complex Subunit Pdh-E3l	TGGT1_305980	S7UIE0	202.5312	67.5214505	4.5765	14.73	457650000
Glutathione S-Transferase_N- Terminal Domain Containing Protein	TGGT1_306030	A0A125YIG3	1261.889	38.4015233	8.9358	35.14	893580000
Vacuolar Atp Synthetase	TGGT1_212310	S7WBL3	893.5934	17.5908574	5.3462	10.59	534620000
Facilitative Glucose Transporter Gt1	TGGT1_214320	A0A125YKB0	860.9253	62.4295164	10.2579	9.86	1025790000
Phosphatidylserine Decarboxylase	TGGT1_225550	Q1PCQ8	343.1329	48.6232212	1.6682	23.19	166820000
Atpase_Aaa Family Protein	TGGT1_234420	S7W4G4	1086.993	66.9910066	19.986	33.33	1998600000
Pyroline-5-Carboxylate Reductase	TGGT1_236070	S7W608	315.0926	36.767599	2.569	21.96	256900000
Protein Tyrosine Phosphatase Family Protein_Ptpla Protein	TGGT1_311290	A0A125YHT1	1125.633	30.9623417	5.9663	19.71	596630000

	Phytanoyl-Coa Dioxygenase (Phyh) Superfamily Protein	TGGT1_313970	S7UU29	166.9608	97.7368862	1.5585	12.25	155850000
	3-Ketoacyl-(Acyl-Carrier-Protein) Reductase	TGGT1_217740	S7V1K3	388.4642	39.2383842	2.7771	19.95	277710000
	Pci Domain-Containing Protein	TGGT1_217820	A0A125YQU9	734.7318	51.8942769	2.7345	33.69	273450000
	Dihydropolyllysine-Residue Succinyltransferase Component Of Oxoglutarate Dehydrogenas	TGGT1_219550	A0A125YJF0	136.8761	50.4682992	1.9127	9.15	191270000
	Cytochrome C1_ Heme Protein	TGGT1_246540	S7W9J5	1142.065	46.2537093	15.3696	20.1	1536960000
	Glucose-6-Phosphate 1- Dehydrogenase	TGGT1_278830	S7UZN8	609.1195	98.8976114	8.2661	17.88	826610000
Micronemos	Microneme Protein Mic4	TGGT1_208030	A0A125YP10	231.6466	65.1882932	6.4514	3.62	645140000
	Microneme Protein Mic1	TGGT1_291890	S7VXI3	1154.092	49.6986895	13.239	39.04	1323900000
	Mic2-Associated Protein M2Ap	TGGT1_214940	A0A125YM06	546.9774	34.9153201	2.26	19.09	226000000
	Microneme Protein Mic6	TGGT1_218520	S7V1D9	165.2843	37.7969274	3.2712	14.9	327120000
Asociadas a microtubulos	Cell Division Protein Cdc48Ap	TGGT1_321640	S7UJ74	154.224	113.728989 5	1.6107	7.76	161070000
	Microtubule Associated Protein Spm2	TGGT1_286590	S7VVS9	1281.501	40.1272999	12.8929	24.65	1289290000
	Microtubule Associated Protein Spm1	TGGT1_263520	S7UXQ8	1945.457	39.1940324	35.604	41.03	3560400000
	Beta-Tubulin	TGGT1_266960	A0A125YWG 4	9521.853	50.5866747	129.385	46.1	1293850000 0
	Nle (Nuc135) Domain-Containing Protein	TGGT1_309950	S7US67	178.4286	65.9953566	2.0698	10.66	206980000
	Alpha Tubulin Tuba1	TGGT1_316400 B	S7UL74	12176.53	48.5335742	69.6953	54.17	6969530000
	Mitotic Checkpoint Protein_ Bub3 Family Protein	TGGT1_219590	S7V1Q8	671.2526	53.2783178	7.2554	30.28	725540000
	Centrin 2	TGGT1_250340	S7V0C6	765.9388	19.1535171	6.4551	67.65	645510000
Multifuncionale s	Swi2/Snf2 Iswi-Like Sant	TGGT1_321440	S7UJ91	204.3252	140.949358 3	1.825	8.81	182500000
	Wd Domain_ G-Beta Repeat Domain Containing Protein	TGGT1_320210	A0A125YIX6	1398.571	56.822137	11.071	34.95	1107100000
	Wd Domain_ G-Beta Repeat- Containing Protein	TGGT1_239590	S7US24	327.1815	75.6523448	2.5937	16.37	259370000

	Wd Domain_ G-Beta Repeat-Containing Protein	TGGT1_243540	S7VMQ4	667.8878	78.0442447	2.4258	9.56	242580000
	Signal Recognition Particle Receptor Alpha Subunit	TGGT1_280610	S7UTQ2	151.209	61.2142259	2.2629	6.29	226290000
	Ras Family Protein	TGGT1_257340	A0A125YZS8	472.8814	23.8090597	1.962	16.36	196200000
	Arm Repeats Containing Protein	TGGT1_261440	A0A125YNN4	276.7339	30.908869	3.9146	14.6	391460000
	Wd Domain_ G-Beta Repeat-Containing Protein	TGGT1_232380	S7V2N8	141.3026	135.676597	2.7176	9.67	271760000
	Wd-40 Repeat Protein	TGGT1_290850	A0A125YRT1	632.8618	59.1070128	3.7283	31.86	372830000
	Wd Domain_ G-Beta Repeat-Containing Protein	TGGT1_214200	S7UR27	169.5684	152.649606 2	4.4696	13.97	446960000
	14-3-3 Superfamily Protein	TGGT1_227952	S7WD67	976.9523	48.2784026	5.0169	14.22	501690000
	Transducin Beta-Like Protein Tbl1	TGGT1_309140	S7W7K9	273.4679	85.4406545	5.0044	21.79	500440000
	Ruvb Family 1 Protein	TGGT1_219590	S7V1Q8	671.2526	53.2783178	7.2554	30.28	725540000
	Slc30A2 Protein	TGGT1_251630	S7V0D3	173.5308	99.0431533	7.2289	6.7	722890000
Núcleo	Endonuclease/Exonuclease/Phosphatase Family Protein	TGGT1_293190	A0A125YFF1	248.8239	77.1964947	4.6101	15.54	461010000
	Dead/Deah Box Helicase Domain-Containing Protein	TGGT1_294350	A0A125YTI5	122.6557	275.901899 8	3.5897	9.2	358970000
	Transcription Initiation Factor Tfiid Complex Subunit Taf6	TGGT1_295410	A0A125YIP6	154.7025	93.5439061	2.9008	12.27	290080000
	Histone H2Bv	TGGT1_209910	A0A125YMF4	8323.159	13.7319659	59.992	34.96	5999200000
	Dead-Family Helicase	TGGT1_298020	S7VTJ1	134.5806	131.450538 3	2.123	8.2	212300000
	Helicase Associated Domain (Ha2) Protein	TGGT1_318440	S7UJM8	167.4657	238.729820 9	4.4116	11.24	441160000
	Regulator Of Chromosome Condensation Rcc1	TGGT1_213900	S7UNK6	471.3037	123.799999 1	3.8835	9.7	388350000
	Swirm Domain-Containing Protein	TGGT1_286920	S7UP96	460.8496	84.7438713	3.5681	19.87	356810000
	Nuclease And Tudor Domain-Containing Protein	TGGT1_238050	S7URW3	578.4359	115.363121 3	11.4922	31.93	1149220000
	Histone H4	TGGT1_239260	A0A125YHU3	10746.48	11.4394697	182.163 7	58.25	1821637000 0
	S1/P1Nuclease	TGGT1_240280	S7URY7	338.481	49.0099665	4.892	23.01	489200000
	Dna-Directed Rna Polymerase Ii Rpb5	TGGT1_240590	A0A125YNC0	378.2594	24.1887265	1.7457	12.2	174570000

Nuclear Transport Factor 2 (Ntf2) Domain-Containing Protein	TGGT1_243960	A0A125YLE0	454.4673	84.4097383	4.7605	15.56	476050000
Dead/Deah Box Helicase Domain-Containing Protein	TGGT1_244000	S7UFQ1	78.6077	112.3721076	1.878	3.67	187800000
Nuclear Factor Nf4	TGGT1_205580	A0A125YNJ4	1567.96	51.3352252	14.404	25.55	1440400000
Nuclear Factor Nf3	TGGT1_260440	S7UYU1	674.0312	34.2707279	10.8733	19.55	1087330000
Pumilio-Family Rna Binding Repeat-Containing Protein	TGGT1_260600	S7UYD1	289.0808	174.4473487	6.39	16.29	639000000
Dnaj Family Sec63 Protein	TGGT1_260630	A0A125YNT8	150.929	77.7863117	6.2113	9.48	621130000
Histone H3	TGGT1_261240	A0A125YSM0	2069.446	15.4591046	128.6748	23.53	12867480000
Histone H2A1	TGGT1_261250	S7UYT4	5834.132	19.7170066	21.5628	17.78	2156280000
Histone H2Ax	TGGT1_261580	A0A125YFR2	1378.362	14.5670543	23.8949	11.85	2389490000
Sac3/Ganp Family Protein	TGGT1_262040	S7UXN8	817.6252	30.1499164	5.8277	25.65	582770000
Rna Recognition Motif-Containing Protein	TGGT1_262620	A0A125YHM1	3311.647	31.931521	35.3094	36.18	3530940000
Cmcg Kinase_Ck2 Family	TGGT1_263070	S7WDT1	358.6972	60.495831	8.5302	22.26	853020000
14-3-3 Protein	TGGT1_263090	A0A125YLJ3	5095.754	37.4020379	17.5619	42.11	1756190000
Pre-Mrna Processing Splicing Factor Prp8	TGGT1_231970	S7WJ21	398.6268	293.0693376	6.4901	17.26	649010000
Dnaj Domain-Containing Protein	TGGT1_232050	S7V2Q7	578.4925	96.4997492	4.4066	17.61	440660000
Rna Recognition Motif-Containing Protein	TGGT1_268200	A0A125YJ74	565.4996	66.7725476	6.8291	22.22	682910000
Mif4G Domain-Containing Protein	TGGT1_269180	S7WKZ1	95.0792	274.3880485	4.2113	6.97	421130000
Gar1 Protein Rna Binding Region Protein	TGGT1_272010	A0A125YY65	611.6163	21.0454823	4.5436	22.86	454360000
Mrna Export Protein	TGGT1_272350	A0A125YTD5	298.1484	42.0481186	6.1518	27.2	615180000
Cell Division Protein Cdc48Cy	TGGT1_273090	A0A125YX44	247.9956	90.1955854	1.8967	16.77	189670000
Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 41 Family Protein	TGGT1_210360	S7UPR4	191.0762	74.0531501	1.7901	15.07	179010000
Dnaj Domain-Containing Protein	TGGT1_267430	A0A125YWW6	1410.655	49.4498065	11.2607	28.94	1126070000
Nol1/Nop2/Sun Family Protein	TGGT1_288530	A0A125YRB9	210.4435	88.1364521	3.7583	11.44	375830000
Ruvb Family 2 Protein	TGGT1_288860	A0A125YQV7	219.3415	55.7886044	2.6852	21.26	268520000

Ccr4-Not Complex Component_ Not1 Protein	TGGT1_291140	S7UQ42	118.3842	267.848703 3	3.3177	7.88	331770000
Xpa Binding Protein 2 Family Protein	TGGT1_305240	S7UI45	365.0882	112.417516 6	4.0764	13.56	407640000
Corepressor Complex Crc230	TGGT1_305340	S7VWG3	435.4604	208.912967 2	11.7405	20.2	1174050000
Xpg N-Terminal Domain-Containing Protein	TGGT1_212250	S7UVX9	383.4857	88.1419558	7.0498	17.6	704980000
Sjogren'S Syndrome/Scleroderma Autoantigen 1 (Autoantigen P27) Protein	TGGT1_212260	S7W4J8	240.5116	38.4807856	3.5428	21.08	354280000
Dnaj Domain-Containing Protein	TGGT1_226068	S7W5E1	769.9825	50.3859863	9.5772	17.83	957720000
Histone Deacetylase Hdac3	TGGT1_227290	A0A125YPH2	800.8434	50.9711755	9.1017	28.6	910170000
Ap2 Domain	TGGT1_227900	S7W5X1	105.0793	135.190056 1	1.4998	10.37	149980000
Prp31-15.5K-U4 Snrna Complex Family Protein	TGGT1_236580	S7VZI5	642.2745	20.403615	19.0846	15.93	1908460000
Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 17	TGGT1_236650	A0A125YWJ5	2709.488	60.280407	20.1308	37.27	2013080000
Myb Family Dna-Binding Domain-Containing Protein	TGGT1_275480	S7VYM2	181.3145	99.4443081	3.9093	8.22	390930000
Fuse-Binding Protein 2 / Kh-Type Splicing Regulatory Protein	TGGT1_216670	S7VUJ0	1062.786	100.392048 3	12.1268	37.51	1212680000
Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide Ddx39	TGGT1_216860	A0A125YNR1	1166.022	49.5133296	7.6387	32.95	763870000
Guanine Nucleotide-Binding Protein	TGGT1_216880	A0A125YYR8	3914.454	35.7746503	47.3125	30.22	4731250000
Dead/Deah Box Helicase Domain-Containing Protein	TGGT1_309570	S7USV3	526.5371	92.0084202	5.7839	20.62	578390000
Ap2 Domain Transcription Factor Ap2Xi-3	TGGT1_310950	S7UT71	122.8646	136.063825 6	2.6439	5.43	264390000
Fibrillarin	TGGT1_311430	S7UTZ7	1788.284	32.0456624	7.2838	27.72	728380000
Dead/Deah Box Atp-Dependent Rna Helicase	TGGT1_312990	A0A125YGG 3	222.8263	64.3035705	3.3593	16.7	335930000
Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide Ddx6	TGGT1_313010	S7W8B2	419.8286	53.9745599	5.0596	24.63	505960000
Gtp-Binding Nuclear Protein Ran/Tc4	TGGT1_248340	S7V0L0	2818.05	26.1117945	11.6759	49.34	1167590000

	Endonuclease/Exonuclease/Phosphatase Family Protein	TGGT1_249030	S7W971	563.0356	62.1387397	8.4192	22.55	841920000
	Histone H2Bb	TGGT1_251870	A0A125YW36	10986.8	12.6318498	52.0148	30.43	5201480000
	Histone H2Az	TGGT1_300200	A0A125YP80	5331.54	15.919761	34.4318	25.81	3443180000
	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide DDX3X	TGGT1_226250	A0A125YSI6	78.9920296	286.6623	3.8773	13.76	380000000
Otras	Carrier Superfamily Protein	TGGT1_208560	A0A125YPP8	689.9344	73.300456	3.6508	20.9	365080000
	Formate/Nitrite Transporter Protein	TGGT1_209800	A0A125YSC6	710.7565	44.9744107	11.5523	18.93	1155230000
	Pdi Family Protein	TGGT1_232410	A0A125YMM2	9992.68	25.0234529	119.2854	60.91	11928540000
	Kruf Family Protein	TGGT1_251170	S7V0H8	446.3969	67.6489386	2.9898	14.4	298980000
Proteasas	Atp-Dependent Metallopeptidase Hflb Subfamily Protein	TGGT1_202630	S7WAJ3	251.4497	129.2254005	6.1119	12.88	611190000
	Trypsin Domain-Containing Protein	TGGT1_262920	S7UXW4	711.7296	104.6250847	10.6948	19.96	1069480000
	Rhoptry Metalloprotease Toxolysin Tln1	TGGT1_269885A	S7V3X7	2472.224	142.6425993	54.6304	45	5463040000
	Rhoptry Metalloprotease Toxolysin Tln1	TGGT1_269885B	S7V463	2506.786	63.2812206	45.3184	32.08	4531840000
	Leucyl Aminopeptidase Lap	TGGT1_290670	S7UP88	156.5371	84.2164366	2.1178	5.89	211780000
	Aspartyl Protease Asp3	TGGT1_246550	A0A125YUQ4	374.6574	69.8161728	15.0499	18.2	1504990000
Putativas	Putative Translocation Protein Sec62	TGGT1_293570	A0A125YTM7	577.15	45.7552453	6.2702	30.26	627020000
	Putative Eukaryotic Initiation Factor-3 Subunit 8	TGGT1_294620	A0A125YXE7	1073.363	109.9341335	13.0407	22.97	1304070000
	Putative Elongation Factor 1-Alpha (Ef-1-Alpha)	TGGT1_294800B	S7UIU6	7586.794	34.0445746	3.3934	50.32	339340000
	Putative Cytochrome C Oxidase Subunit	TGGT1_209260	A0A125YRQ4	2591.359	35.2111959	10.3544	30	1035440000
	Putative Beta-Tubulin	TGGT1_221620	A0A125YYZ4	9681.832	50.4935749	88.6409	48.33	8864090000
	Putative Eukaryotic Translation Initiation Factor	TGGT1_222860	A0A125YS98	611.9846	89.0193989	13.3414	14.55	1334140000
	Putative Transmembrane Protein	TGGT1_410360	S7ULN4	8489.347	38.3072527	67.4416	29.38	6744160000
	Putative Importin Alpha	TGGT1_252290	A0A125YIC7	160.679	59.9877793	6.0899	18.53	608990000

Putative N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Protein	TGGT1_318510	A0A125YPA5	199.8633	84.2084642	3.6081	14.38	360810000
Putative Ubiquinol Cytochrome C Oxidoreductase	TGGT1_320220	S7UK06	1252.422	55.3625911	11.3362	46.61	1133620000
Putative Swi2/Snf2 Brahma	TGGT1_320300	S7UK27	192.9163	184.0992	5.1891	11.55	518910000
Putative Elongation Factor 1-Alpha (Ef-1-Alpha)	TGGT1_286420 A	S7W358	12133.93	50.0196417	70.2767	51.79	7027670000
Putative Rhopty Kinase Family Protein Rop34	TGGT1_240090	S7UR61	163.4973	61.7156263	1.5838	11.03	158380000
Putative Chaperonin Cpn60	TGGT1_240600	S7W6R0	876.6893	72.5089637	13.4263	29.84	1342630000
Putative Coatomer Protein Complex_Subunit Alpha	TGGT1_240650	A0A125YGM0	260.7365	144.4938309	2.7592	17.46	275920000
Putative Ribosome Biogenesis Protein Nsa2	TGGT1_242800	A0A125YNA7	194.2216	30.2664937	2.9366	7.31	293660000
Putative Prohibitin	TGGT1_243950	A0A125YRG2	3396.667	30.2788288	54.1251	43.17	5412510000
Putative 2-Oxoglutarate Dehydrogenase E1 Component_Mitochondrial Precursor	TGGT1_244200	S7UEM2	302.1369	125.277558	15.6965	13.17	1569650000
Putative Tdc1	TGGT1_244370	S7UFY7	660.3634	65.5292387	17.4897	4.62	1748970000
Putative Heat Shock Protein 90	TGGT1_244560	S7VTT7	1909.826	97.8394735	23.6753	32.83	2367530000
Putative Eukaryotic Initiation Factor-3 Subunit 10	TGGT1_201680	S7WB14	649.309	119.5407604	8.4708	13.97	847080000
Putative Peptidase M16_Alpha Subunit	TGGT1_202680	A0A125YN38	1258.72	62.6749121	19.5848	27.18	1958480000
Putative Atpase Synthase Subunit Alpha	TGGT1_204400	S7UU80	2772.197	62.6025614	58.0514	22.88	5805140000
Putative U5 Snmp-Associated Subunit	TGGT1_205220	S7UTZ4	114.1638	123.9299543	4.888	6.02	488800000
Putative Integral Membrane Protein_Gns1/Sur4 Family Protein	TGGT1_205350	A0A125YTU7	701.6171	38.0224154	5.5484	9.75	554840000
Putative Translation Elongation Factor 2 Family Protein	TGGT1_205470	A0A125YJ59	456.0076	94.1732055	12.1032	20.67	1210320000
Putative Nucleolar Protein 5	TGGT1_205510	S7UUJ5	1969.715	54.4488014	16.196	41.84	1619600000

Putative Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A_ Isoform 3	TGGT1_256770	A0A125YSV5	634.5443	45.6393814	4.6615	17.72	466150000
Putative Vacuolar Atp Synthase Subunit A	TGGT1_256970	S7WF08	237.8557	68.7755054	4.7516	19.16	475160000
Putative Heat Shock Protein 101	TGGT1_257990	S7UZ38	245.1908	104.767768 6	1.2415	18.55	124150000
Putative Myosin Heavy Chain	TGGT1_258060	S7W7F1	567.922	23.561996	1.1989	18.75	119890000
Putative Dnaj Protein	TGGT1_258390	S7W7H7	764.7112	45.0183138	5.6553	40.05	565530000
Putative Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 12	TGGT1_258770	A0A125YL07	223.0828	79.7426593	4.8568	11.85	485680000
Putative Vacuolar Atp Synthase Subunit D	TGGT1_259010	S7UYG8	2382.715	45.1793098	15.2927	53.28	1529270000
Putative Centrin	TGGT1_260670	S7W7A1	156.3354	26.6961592	3.0108	10.5	301080000
Putative Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide A'	TGGT1_229210	A0A125YG91	544.9166	28.8661216	2.3582	23.23	235820000
Putative Calcium Binding Protein Precursor	TGGT1_229480	S7V2K1	690.1583	38.3912356	5.5351	45.67	553510000
Putative Splicing Factor 3B_ Subunit 3	TGGT1_230960	A0A125YIG2	188.2966	137.454833	3.0293	11.19	302930000
Putative Omega Secalin	TGGT1_231960	S7WBR2	568.3659	122.624888 1	26.2056	21.78	2620560000
Putative Vacuolar Proton Translocating Atpase Subunit A	TGGT1_232830	S7WBT9	703.2971	101.890548 5	14.4519	28.49	1445190000
Putative Cell-Cycle-Associated Protein Kinase Erk7	TGGT1_233010	S7WC30	597.9629	74.6090019	13.6118	13.15	1361180000
Putative Crooked Neck Family 1 Protein Isoform 2	TGGT1_269200	S7V4C3	236.034	82.2910884	3.4516	12.54	345160000
Putative Calmodulin	TGGT1_269442	S7V4T6	4264.865	9.7802431	27.5454	72.41	2754540000
Putative Preprotein Translocase Sec61	TGGT1_269980	A0A125YSW 3	1220.902	52.5637926	31.1713	15.64	3117130000
Putative 3-Ketoacyl-Coa Reductase	TGGT1_271888	A0A125YR36	1972.758	38.2274465	18.1434	26.61	1814340000
Putative Coatomer Gamma 2-Subunit Protein	TGGT1_273370	S7V3E5	211.3959	113.537101	3.0823	17.62	308230000
Putative Kinesin Heavy Chain	TGGT1_273560	S7V3F2	270.5523	182.024941 2	4.3511	15.78	435110000
Putative Proliferation-Associated Protein 2G4	TGGT1_279390	A0A125YVJ6	616.4298	51.1480029	8.0656	8.66	806560000

Putative Eukaryotic Initiation Factor-3_Delta Subunit	TGGT1_289830	A0A125YIM0	228.4407	38.679176	4.7715	24.78	477150000
Putative Sortilin	TGGT1_290160	S7UPZ2	1427.775	114.555730	14.1226	21.78	1412260000
Putative Clathrin Heavy Chain	TGGT1_290950	A0A125YSB0	6013.099	195.902326	98.1356	44.95	9813560000
Putative Glycine C-Acetyltransferase	TGGT1_290980	A0A125YFY9	175.3315	64.2207798	3.1522	12.61	315220000
Putative Calmodulin	TGGT1_305050	A0A125YT25	4531.015	15.4484094	18.5685	54.14	1856850000
Putative Vacuolar Atp Synthase Subunit E	TGGT1_305290	S7UI40	269.6902	39.4712537	1.0646	17.68	106460000
Putative Small Gtp Binding Protein Rab1A	TGGT1_214770	S7W5S1	628.7937	23.1651994	3.0858	10.89	308580000
Putative Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 3 Family 1 Ascc3L1	TGGT1_223390	S7W4M7	688.675	249.782126	11.386	25.24	1138600000
Putative Eukaryotic Initiation Factor-4E	TGGT1_223410	A0A125YS61	1162.006	26.095555	5.3791	32	537910000
Putative Thioredoxin	TGGT1_224060	A0A125YVC0	139.0305	69.1762124	3.4295	14.47	342950000
Putative Aminopeptidase N	TGGT1_224460	S7UWT6	1335.557	109.175425	12.8498	31.86	1284980000
Putative Polyadenylate Binding Protein	TGGT1_224850	S7UWI4	2008.04	83.0971648	20.6543	19.64	2065430000
Putative Adenylate Kinase	TGGT1_224900	A0A125YJX8	832.3547	28.7889644	2.3649	38.13	236490000
Putative Membrane Protein	TGGT1_225730	A0A125YLN4	1847.425	14.9613128	9.6866	19.53	968660000
Putative Atp Synthase	TGGT1_226000	A0A125YRE2	1668.886	19.5712201	7.0399	24.04	703990000
Putative Cytochrome C	TGGT1_226590	A0A125YNU6	253.2292	34.7168878	8.3106	17.73	831060000
Putative Syntaxin 5	TGGT1_226600	A0A125YTV9	197.9346	32.3674872	1.4625	27.56	146250000
Putative Eukaryotic Initiation Factor-3_Subunit 5	TGGT1_228190	A0A125YGD9	1997.764	38.4688076	2.7687	19.36	276870000
Putative Eukaryotic Initiation Factor-2 Gamma	TGGT1_235970	A0A125YRD1	1588.618	51.1930573	11.5139	28.82	1151390000
Putative Peptidase M16 Family Potein	TGGT1_236210	S7W617	1494.361	57.3153179	27.7441	23.38	2774410000
Putative Small Gtpase Rab2	TGGT1_312050	A0A125YL13	1142.586	24.4375468	2.7984	18.22	279840000
Putative Mitochondrial Inner Membrane Translocase Subunit Tim17	TGGT1_312220	S7UTH6	686.7254	22.7936913	2.8476	45.07	284760000

Putative 60S Ribosomal Protein L7A	TGGT1_313560	A0A125YHF8	1309.961	19.4225429	21.8355	8.67	2183550000	
Putative Aquarius	TGGT1_314410	S7W963	149.2591	252.138678 3	4.2719	9.08	427190000	
Putative Rhoptyr Protein	TGGT1_315210	S7ULH8	260.0081	116.751094 1	16.95	5.25	1695000000	
Putative Myosin Regulatory Light Chain	TGGT1_315780	A0A125YT28	686.4442	23.1242918	7.1092	40.78	710920000	
Putative Eukaryotic Porin	TGGT1_218280	S7V1F0	2320.79	50.7408963	63.5856	35.62	6358560000	
Putative Vacuolar Atp Synthase Subunit B	TGGT1_219800	A0A125YPJ0	265.3767	56.842597	3.7104	17.62	371040000	
Putative Nucleolar Protein	TGGT1_247470	A0A125YGZ6	885.2245	60.4529695	23.1693	23.32	2316930000	
Putative Calmodulin	TGGT1_249240	A0A125YS28	520.2241	16.8047495	2.6591	39.6	265910000	
Putative Adenine Nucleotide Translocator	TGGT1_249900	A0A125YLS5	12571.01	35.4840478	177.999 2	58.18	1779992000 0	
Putative Eukaryotic Initiation Factor-4A	TGGT1_250770	A0A125YLG0	5480.943	46.958695	38.3897	61.65	3838970000	
Putative Eukaryotic Initiation Factor-3_ Subunit 3	TGGT1_251500	S7UZZ8	346.989	66.3991515	2.6515	19.5	265150000	
Putative Translation Initiation Factor Eif-5A	TGGT1_251810	A0A125YIS3	1344.766	17.6959608	3.6118	23.6	361180000	
Putative Nucleolar Protein_ Structural Component Of H/Aca Snornp	TGGT1_278270	A0A125YM51	1650.855	7.482515	3.7256	17.19	372560000	
Putative Phosphate Carrier	TGGT1_278990	A0A125YTR2	5118.655	53.8917923	67.9016	31.11	6790160000	
Putative Transmembrane Protein	TGGT1_410370	S7VU98	10142.73	47.910181	59.2732	45.98	5927320000	
Putative Transmembrane Protein	TGGT1_411470	S7UG13	7011.834	40.6056403	20.9527	44.96	2095270000	
Relacionada a actina	Profilin Prf	TGGT1_293690	S7UIQ6	1946.146	180.266137	15.8452	35.15	1584520000
	Actin Act1	TGGT1_209030	A0A125YH17	5459.764	421.930307	68.8549	48.67	6885490000
Msp (Major Sperm Protein) Domain-Containing Protein		TGGT1_318160	S7UKE9	5017.97	260.324636	44.3832	34.73	4438320000
	Myosin H	TGGT1_243250	A0A125YQD3	462.6852	1710.28093 9	12.8403	19.43	1284030000
	Myosin C	TGGT1_255190	S7WI35	1491.83	1339.26528 1	20.6574	26.56	2065740000
	Myosin Light Chain Mlc1	TGGT1_257680	A0A125YYD3	5718.51	244.092349	33.8088	22.07	3380880000
	Actin Like Protein Alp2A	TGGT1_258050	S7WER0	347.1092	607.75544	6.2615	22.65	626150000

	Myosin A	TGGT1_235470	S7W634	10612.16	939.611894	201.9717	50.06	20197170000
	Acid Phosphatase Gap50	TGGT1_219320	S7V1S3	10015.06	468.340934	183.6407	36.89	18364070000
	Calmodulin Cam1	TGGT1_246930	A0A125YXA3	533.3412	192.207957	3.0383	27.37	303830000
	Myosin F	TGGT1_278870	S7UZI5	311.6106	2191.322108	9.224	22.79	922400000
	Actin	TGGT1_411760	S7VNC9	3335.332	324.008136	76.6299	34.49	7662990000
Relacionado a filamentos intermedios	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc7	TGGT1_222220	A0A125YVP0	2617.854	47.0122557	27.8412	57.81	2784120000
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc6	TGGT1_220270	S7VPD3	928.2495	48.9872141	7.6008	22.75	760080000
	Putative Trichohyalin B	TGGT1_242790	S7W0Q0	175.1517	137.8391455	2.5564	16.56	255640000
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc14	TGGT1_260540	S7UYYY7	1675.249	84.1593228	11.297	31.92	1129700000
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc10	TGGT1_230210	S7WBA5	3069.777	61.4030881	63.1291	38.93	6312910000
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc4	TGGT1_231630	A0A125YPPY9	5233.653	50.6280764	51.6119	35.62	5161190000
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc1	TGGT1_231640	A0A125YFV6	8203.075	70.3949062	169.0871	44.5	16908710000
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc3	TGGT1_216000	A0A125YIN0	2280.779	58.1710984	59.6147	22.68	5961470000
	Alveolin Domain Containing Intermediate Filament Imc12	TGGT1_248700	S7WGS9	6929.867	29.9081471	34.1915	53.43	3419150000
Relacionado a ribosomas	Translation Initiation Factor 3 Subunit	TGGT1_294670	A0A125YLN2	581.3539	31.9836642	4.4036	36.1	440360000
	Ribosomal Protein Rps4	TGGT1_207440	A0A125YYJ0	1859.665	35.7921893	21.7915	29.17	2179150000
	Ribosomal Protein Rps17	TGGT1_207840	A0A125YWE7	7191.903	15.2286669	12.5153	56.06	1251530000
	Ribosomal Protein Rps28	TGGT1_209290	S7UIH9	1749.21	13.3855661	17.2868	30.51	1728680000
	Brix Domain-Containing Protein	TGGT1_222000	S7UL49	354.7855	57.7758227	2.2284	25.39	222840000
	Ribosomal Protein Rps20	TGGT1_223050	S7UL41	1329.66	26.3433589	16.4175	9.01	1641750000

Ribosomal Protein Rpl12	TGGT1_254440	A0A125YT48	2473.129	17.991824	11.0227	15.76	1102270000
Ribosomal Protein Rps10	TGGT1_275810	A0A125YIP7	521.1558	17.3980994	5.0585	21.71	505850000
Ribosomal Protein Rpl17	TGGT1_299050	A0A125YQZ7	5127.913	22.6112256	10.961	24.1	1096100000
Ribosomal Protein Rps6	TGGT1_210690	A0A125YZ10	3733.993	29.0133263	57.2068	40.63	5720680000
Sec61Beta Family Protein	TGGT1_211040	A0A125YP58	1394.107	10.1605361	9.045	44.44	904500000
Protein Disulfide Isomerase	TGGT1_211680	A0A125YQI9	231.1707	53.0872337	2.4555	17.62	245550000
Ribosomal Protein Rpl5	TGGT1_320050	A0A125YYH7	2587.123	35.455716	55.7154	50.65	5571540000
Ribosomal Protein Rps15	TGGT1_213350	A0A125YHZ1	3915.343	17.2142104	23.6904	18.67	2369040000
Ribosomal Protein Rpl9	TGGT1_284560	A0A125YRM 1	2244.948	21.7092816	20.484	42.63	2048400000
Elongation Factor 2 Family Protein	TGGT1_286080	S7UP08	544.5073	114.084828	15.4884	20.54	1548840000
Ribosomal Protein Rpl23A	TGGT1_238010	S7W653	4326.323	18.6757915	51.5947	28.14	5159470000
Ribosomal Protein Rpl36	TGGT1_238250	A0A125YHS1	8227.614	11.407607	24.8134	21.78	2481340000
Ribosomal Protein Rps7	TGGT1_239100	A0A125YZ18	9182.883	22.6447059	33.375	64.29	3337500000
Ribosomal Protein Rpl22	TGGT1_239760	A0A125YT45	2893.309	15.1876743	15.1064	34.59	1510640000
Ribosomal Protein Rps5	TGGT1_242330	A0A125YNF8	1112.614	21.8983269	3.083	39.58	308300000
Ribosomal Protein Rps26	TGGT1_243570	A0A125YVY8	1381.253	13.0677071	30.6453	10.71	3064530000
Ribosomal Protein Rpl8	TGGT1_204020	A0A125YV56	7872.651	28.3688193	69.0451	38.08	6904510000
Ribosomal Protein Rps12	TGGT1_205340	A0A125YN62	1160.866	15.7408511	14.5713	16.2	1457130000
Ribosomal Protein Rps21	TGGT1_259240	S7WEL7	1778.635	9.1483117	2.8494	48.78	284940000
Ribosomal Protein Rpp1	TGGT1_260260	A0A125YWZ 1	4405.606	19.0875572	28.5817	25.7	2858170000
Noc2P Family Protein	TGGT1_260320	S7W780	324.1919	116.021829	5.1717	22.3	517170000
Ribosomal Protein Rpl7A	TGGT1_261570	A0A125YW74	3398.125	31.316956	48.326	24.64	4832600000
Ribosomal Protein Rpl18A	TGGT1_262670	A0A125YSP4	7256.23	21.4442427	56.8601	57.92	5686010000
Ribosomal Protein Rpl27	TGGT1_262690	S7UYE2	837.9856	16.3876471	8.9377	19.01	893770000
Ribosomal Protein Rps16	TGGT1_263040	S7UY71	5511.114	24.3434459	32.3932	18.48	3239320000
Ribosomal Protein Rpl13	TGGT1_263050	S7UXX9	1387.855	40.0244473	12.0423	32.68	1204230000
Ribosomal Protein Rps14	TGGT1_263700	S7W6D1	7426.823	16.3585996	44.2071	41.67	4420710000

Glutamate-Trna Ligase	TGGT1_263870	S7WDQ1	217.1095	93.5153337	3.1897	15.34	318970000
Ribosomal Protein Rps23	TGGT1_229670	A0A125YRX1	4511.921	15.8585528	14.8807	30.07	1488070000
Ribosomal Protein Rpl38	TGGT1_231080	A0A125YR20	2058.312	9.6403625	10.5121	25	1051210000
Ribosomal Protein Rps3	TGGT1_232300	S7V3B5	2479.363	29.0368191	45.4391	20.78	4543910000
18S Rrna Biogenesis Protein Rcl1 Protein	TGGT1_232390	A0A125YMK4	184.9032	48.379157	1.8231	11.99	182310000
Ribosomal Protein Rps3A	TGGT1_232710	A0A125YZM8	9680.372	29.8847774	49.7064	47.88	4970640000
Ribosomal Protein Rps13	TGGT1_270380	S7V498	2823.513	17.176319	37.8483	53.64	3784830000
Asparaginyl-Trna Synthetase (Nob+Trna Synthase)	TGGT1_270510	S7WKJ0	709.5002	75.8885402	6.9585	20.41	695850000
Arginyl-Trna Synthetase	TGGT1_270690	A0A125YS10	548.5577	131.054157	5.2619	25.3	526190000
Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit 6 Interacting Protein	TGGT1_273460	A0A125YVE2	832.5369	75.6442666	13.6094	29.42	1360940000
Ribosomal Protein Rpsa	TGGT1_266060	A0A125YJG1	5955.619	31.7401208	36.3195	45.99	3631950000
Ribosomal Protein Rpl31	TGGT1_266070	A0A125YYY2	1829.548	14.4126799	6.5179	33.33	651790000
Ribosomal Protein Rpl14	TGGT1_267060	S7VPP6	1684.035	18.0491955	16.4388	30.57	1643880000
Ribosomal Protein Rpl32	TGGT1_267400	A0A125YTP3	9456.939	15.674293	34.9768	47.01	3497680000
Tryptophanyl-Trna Synthetase (Trprs2)	TGGT1_288360	A0A125YPX8	190.5008	77.5738441	2.6839	17.13	268390000
Ribosomal Protein Rpl19	TGGT1_289530	A0A125YMW0	2758.055	22.2744273	11.9035	21.39	1190350000
Ribosomal-Ubiquitin Protein Rpl40	TGGT1_289750	A0A125YNY4	8412.589	14.9703766	58.2186	46.51	5821860000
Rna Recognition Motif-Containing Protein	TGGT1_291330	A0A125YM75	445.0635	25.5693875	3.0744	22.81	307440000
Ribosomal Protein Rpl13A	TGGT1_292130	A0A125YU05	6624.867	33.1486435	91.1443	30.42	9114430000
Ribosomal Protein Rps2	TGGT1_305520	A0A125YUG2	3480.677	29.6210877	54.5706	31.6	5457060000
Ribosomal Protein Rps19	TGGT1_212290	S7UVX4	2150.745	35.8240261	26.0163	16.93	2601630000
Rrna Pseudouridine Synthase	TGGT1_214210	A0A125YRK0	525.5273	57.3716175	3.7161	30.5	371610000
Ribosomal Protein Rps24	TGGT1_215460	S7UQS1	3945.35	30.5461816	33.2478	21.72	3324780000
Ribosomal Protein Rpl10A	TGGT1_215470	A0A125YJN6	2180.714	24.7743112	18.9759	43.78	1897590000
Ribosomal Protein Rps18	TGGT1_225080	A0A125YQT9	4260.924	17.83664	47.9526	43.59	4795260000

Pre-Rrna Processing Protein	TGGT1_225125	S7W597	137.6676	313.190543	4.9649	12.68	496490000	
Ribosomal Protein Rpl3	TGGT1_227360	A0A125YQV1	2912.732	44.569857	16.3771	28.02	1637710000	
Ribosomal Protein Rpl15	TGGT1_228470	A0A125YX54	4037.136	24.6107741	24.0219	17.56	2402190000	
Ribosomal Protein Rps15A	TGGT1_234450	S7UWC7	1995.583	27.1024917	45.4347	27.71	4543470000	
Rna Recognition Motif-Containing Protein	TGGT1_236540	S7URE6	1061.815	53.1318093	12.4586	19.88	1245860000	
Ribosomal Protein Rpl4	TGGT1_309120	A0A125YTR1	12342.4	46.0332614	141.5562	37.98	14155620000	
Ribosomal Protein Rpp2	TGGT1_309810	A0A125YFT3	4112.677	11.7683336	12.0382	84.07	1203820000	
Ribosomal Protein Rpl11	TGGT1_309820	A0A125YTH4	4542.722	20.3133424	47.6445	15.43	4764450000	
Ribosomal Protein Rpl27A	TGGT1_310490	A0A125YTM1	2902.131	16.4583049	20.4794	21.77	2047940000	
Ribosomal Protein Rpl23	TGGT1_312090	A0A125YJR6	479.5547	15.160692	14.7056	5.76	1470560000	
Ribosomal Protein Rpl6	TGGT1_313390	S7UT72	4573.108	36.8702592	33.4706	28.57	3347060000	
Cbf/Mak21 Family Protein	TGGT1_313990	S7W9B0	79.5477	149.820042	4.1339	5.58	413390000	
Ribosomal Protein Rpl7	TGGT1_314810	A0A125YUF5	2945.232	30.1786838	43.5869	26.36	4358690000	
Glutaminyl-Trna Synthetase (Glnrs)	TGGT1_217460	S7V1H6	344.5597	96.1834782	4.3489	16.51	434890000	
Ribosomal Protein Rpp0	TGGT1_218410	A0A125YFP0	6393.401	34.2716408	51.829	39.17	5182900000	
Cytosolic Trna-Ala Synthetase	TGGT1_219540	S7WHV1	430.5088	140.631498	5.2421	13.36	524210000	
Ribosomal Protein Rps8	TGGT1_245460	S7WHE0	6167.369	23.6334102	69.3171	37.07	6931710000	
Ribosomal Protein Rpl21	TGGT1_245680	S7WHD1	1211.742	18.0649703	9.7826	12.74	978260000	
Ribosomal Protein Rps9	TGGT1_248480	A0A125YWF5	3561.96	21.6843047	15.7725	52.66	1577250000	
Ribosomal Protein Rpl35A	TGGT1_249250	A0A125YPQ6	2366.138	12.9040815	33.158	20.54	3315800000	
Ribosomal Protein Rpl18	TGGT1_300000	A0A125YRB0	1224.944	21.3410755	11.5725	24.6	1157250000	
Signal Peptidase Subunit Protein	TGGT1_300060	A0A125YZH3	740.859	19.6140933	3.8317	19.43	383170000	
Gpi16 Subunit_ Gpi Transamidase Component Protein	TGGT1_308000	A0A125YHU7	158.5536	84.0603362	1.4386	7.28	143860000	
Ribosomal protein RPL10	TGGT1_288720	A0A125YSQ3	2782.001	25.1431039	42.9424	38.01	4294240000	
Roptrias	Rhoptry Protein Rop4	TGGT1_295125	S7UI50	6140.94	40.4235636	91.8956	42.74	9189560000

Rhoptry Kinase Family Protein Rop24 (Incomplete Catalytic Triad)	TGGT1_252360	S7VW28	730.1231	61.1376613	13.4602	13.08	1346020000	
Rhoptry Protein Rop18	TGGT1_205250	A0A125YQA8	2177.109	62.7416364	57.8322	27.62	5783220000	
Rhoptry Kinase Family Protein Rop35	TGGT1_304740	S7UUU5	541.5986	71.4435529	6.6296	12.97	662960000	
Rhoptry Protein Rop17	TGGT1_258580	S7W7J7	3577.623	69.3394828	31.7602	35.86	3176020000	
Rhoptry Kinase Family Protein Rop39	TGGT1_262050	S7UY96	975.6812	65.7299312	24.6463	29.59	2464630000	
Rhoptry Protein Rop16	TGGT1_262730	S7UXU9	315.271	76.5345973	4.7718	21.36	477180000	
Rhoptry Neck Protein Ron4	TGGT1_229010	S7WIC1	1099.595	107.739012 9	27.0894	41.16	2708940000	
Rhoptry Kinase Family Protein Rop40 (Incomplete Catalytic Triad)	TGGT1_291960	S7UNX9	2033.12	58.418252	28.0481	18.29	2804810000	
Rhoptry Neck Protein Ron8	TGGT1_306060	A0A125YNG1	1632.441	330.403366 8	54.0593	30.17	5405930000	
Rhoptry Protein Rop8	TGGT1_215775	A0A125YM30	1677.316	65.6356162	0.4942	15.65	49420000	
Rhoptry Neck Protein Ron3	TGGT1_223920	S7UWM8	1186.616	224.058198 7	32.0152	31.72	3201520000	
Rhoptry Kinase Family Protein Rop11 (Incomplete Catalytic Triad)	TGGT1_227810	S7W5X8	1334.368	58.7208966	20.5516	26.05	2055160000	
Rhoptry Neck Protein Ron9	TGGT1_308810 B	S7US41	243.0897	115.808638	2.9996	9.85	299960000	
Rhoptry Protein Rop1	TGGT1_309590	S7W7R3	1233.595	49.7130422	25.5402	19.96	2554020000	
Rhoptry Neck Protein Ron1	TGGT1_310010	S7UT16	135.9729	128.623934 5	4.8539	8.03	485390000	
Rhoptry Neck Protein Ron5	TGGT1_311470	S7W8Q7	2060.116	187.938657	71.1198	31.37	7111980000	
Rhoptry Protein Rop13	TGGT1_312270	A0A125YQ57	3977.282	45.1855425	71.9164	29.75	7191640000	
Rhoptry Protein Rop14	TGGT1_315220	S7UMJ4	307.0073	122.780424 7	8.2655	15.46	826550000	
Rhoptry Protein Rop10	TGGT1_315490	S7VV52	530.7427	60.9412987	16.0667	23.55	1606670000	
Rhoptry Neck Protein Ron2	TGGT1_300100	S7UGV9	1463.989	167.187493 1	79.9179	29.14	7991790000	
Rhoptry Protein Rop5	TGGT1_308090	A0A125YX85	2104.172	61.0037781	48.8829	35.7	4888290000	
Rhoptry Protein Rop8	TGGT1_363030	A0A125YM50	3879.401	64.3170673	53.0615	47.42	5306150000	
Rhoptry Protein Rop7	TGGT1_295110	A0A125YJ16	3736.563	63.6984795	23.3832	32.17	2338320000	
Rhoptry Protein Rop5	TGGT1_411430	S7UG16	1747.234	51.6785278	3.0015	36.88	300150000	
Unión a calcio	Thrombospondin Type 1 Domain- Containing Protein	TGGT1_209060	S7VS95	345.8076	96.8380384	8.6764	7.88	867640000

Cyclophilin	TGGT1_221210	A0A125YG57	621.8571	19.6383783	10.5128	29.05	1051280000
Calmodulin Cam2	TGGT1_262010	A0A125YUD0	336.9435	15.5055733	2.164	33.1	216400000
Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca2+- Atpase	TGGT1_230420	A0A125YSA2	303.8346	120.521918 7	5.4822	12.81	548220000
Plasma Membrane-Type Ca(2+)- Atpase A1 Pmcaa1	TGGT1_312100	S7UTU7	354.7041	201.495759 2	7.8726	9.33	787260000
Calmodulin Cam1	TGGT1_246930	A0A125YXA3	533.3412	19.2207957	3.0383	27.37	303830000
